Vol. 1 JANEIRO - 1958 N.º 1

REVISTA

DO

INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE DO RECIFE
ESCOLA SUPERIOR DE QUÍMICA
INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

NSP
RAH
MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
4 SEP 1959

Rev. Inst. Antib. Univ. Recife

PERNAMBUCO – BRASIL

Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife

Fundado em 8 de março de 1952

REITOR DA UNIVERSIDADE DO RECIFE

PROF. DR. JOAQUIM IGNACIO DE ALMEIDA AMAZONAS

DIRETOR DO INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

PROF. DR. OSWALDO GONÇALVES DE LIMA

PESQUISADORES:

EVANS DE AZEVÊDO E SILVA
GERSON PEREIRA PINTO
IVAN LEÔNCIO D'ALBUQUERQUE
JOSÉ OTAMAR FALCÃO DE MORAIS
LINA ROVATI PRADELLA
LUIZ DE ALBUQUERQUE ARAÚJO
MARIA EMILIA SOUTO MAIOR GENN
MARIA HELENA DÁLIA MAIA
MARISA PINHEIRO MACHADO
ORIO CIFERRI

COMISSÃO DE REDAÇÃO
OSWALDO GONÇALVES DE LIMA
LUIZ DE ALBUQUERQUE ARAUJO
JOSÉ OTAMAR FALCÃO DE MORAIS

ENDERÊÇO: Rua Dom Bôsco N.º 1002
Recife, Pernambuco, Brasil

REVISTA

DO

INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/revista-do-instituto-de-antibioticos_1958-01_1_1

As publicações do *Instituto de Antibióticos*, até agora apresentadas quase exclusivamente nos *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco*, passarão doravante a constituir matéria preferencial dêste novo órgão da Universidade do Recife.

A criação desta revista especializada obedeceu à necessidade de oferecermos aos interessados no assunto maior facilidade de conhecimento dos resultados de nossas atividades relacionadas ao estudo dos agentes antimicrobianos.

Merecerá nossa melhor acolhida a colaboração de investigadores — nacionais ou estrangeiros — que desejem utilizar a *REVISTA DO INSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS* como veículo de divulgação de seus trabalhos no campo dos antibióticos.

A Direção

ALGUMAS OBSERVAÇÕES SÔBRE A AÇÃO ANTIFÚNGICA DE UM *STREPTOMYCES SP* (CÊPA 233 — IAUR)

Oswaldo Gonçalves de Lima *Marisa Pinheiro Machado*
Maria Glauce Maciel *Evans Silva*
Maria Helena Dália Maia

(Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife)

No curso dos nossos trabalhos de seleção de actinomicetos produtores de substâncias antifúngicas, foi isolada de amostra de solo da região do agreste (Caruaru, Pernambuco) u'a cêpa de *Streptomyces* de espécie ainda por nós não identificada, apresentando-se antagonista de ácido-resistentes e fungos (*Candida*), conforme se pode verificar no quadro I, obtido por meio da técnica de estrias cruzadas.

Produção do antibiótico:

Nas tentativas de produção de substância ativa, em meios líquidos em cultivo agitado, encontrou-se como mais adequado o meio M_1, da seguinte composição:

Glicose (Karo)	10 g
Farinha de soja	10 g
Carbonato de cálcio	1 g
Cloreto de sódio	5 g
Água destilada	1000 ml

Usou-se como inóculo uma suspensão de esporos produzidos em cultivo da referida cêpa em Czapek sólido a meia concentração salina. A atividade antibiótica máxima é atin-

gida ao cabo de 72 horas, em agitação, com valor próximo de 400 u/ml para *Candida albicans* IBB-50.

QUADRO I

Espectro antimicrobiano da cêpa 233, segundo a técnica de Garré

MICROORGANISMOS DE PROVA	ZONAS DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS		
	MEIOS		
	AN*	AA**	W***
S. aureus	0	16	0
B. subtilis 9	0	0	0
E. coli R	0	0	0
Ps. aeruginosa	0	0	0
K. pneumoniæ	0	0	0
P. morganii	0	0	0
Myc. smegmatis	10	0	0
Myc. phlei	15	16	0
Myc. tub. var. *hom.*	17	0	0
N. asteroides	—	0	0
C. albicans	16	23	0

* AN — agar nutritivo
** AA — "Antibiotic-Assay" BBL
*** W — meio de Waksman.

Extração das substâncias antifúngicas:

Verificou-se que a atividade anti-*Candida* do líquido metabólico se exaure por tratamento do mesmo por acetato de etila, a pH 7,0-7,8.

A matéria impura que provém da evaporação do solvente resultante de repetidas extrações, apresenta-se como u'a substância de consistência graxa e côr pardo-escura, notadamente ativa contra espécies do gênero *Candida* e *Cr. neoformans*, segundo se observa no quadro II.

QUADRO II

Espectro antimicrobiano da substância bruta

Microorganismo	mcg/ml		
	18h	48h	72h
B. subtilis 9	30,5	42,7	—
S. aureus	3,6	8,5	—
S. aureus A 11	> 6,1 < 8,5	—	—
Sar. lutea	—	1,2	—
B. anthracis	1,2	2,4	—
Sh. p. dys.	> 122,1	—	—
E. coli R	> 122,1	—	—
K. pneumoniae	> 122,1	—	—
Sal. typhosa	> 122,1	—	—
Myc. tub. var *hom.*	—	> 122,1	—
Myc. phlei	—	> 122,1	—
Myc. smegmatis	—	> 122,1	—
Br. suis	—	8,5	24,4
C. albicans	—	—	< 0,2
C. krusei	—	7,3	> 14,6
C. albicans	—	0,3	> 0,5 < 0,7
C. tropicalis	—	—	> 14,6
C. parakrusei	—	12,8	14,6
C. pseudotrapicalis	—	< 0,2	—
C. stellatoidea	—	< 0,2	< 0.2
N. asteroides	—	12,8	> 12,8 < 14,6
Cr. neoformans	—	—	0,7
Hist. capsulatum	—	—	> 36,6 < 54,9
Asp. niger	—	54,7	> 83,2

É de notar-se que os dados apresentados no referido quadro prevalecem apenas para meio de cultivo cuja composição não inclui glicose, mesmo em baixa concentração. Foi constatada uma queda de atividade de cêrca de 40 vêzes em comparação com o meio de cultivo destituído de glicose, quando desta substância se adicionaram 100 mg/100 ml.

Nos ensaios preliminares de purificação foram isoladas duas frações que designámos A e B. A primeira, quase insolúvel em água a pH 8,0 apresentou-se com atividade contra *C. albicans*, entre 0,09 e 0,18 mcg/ml.

A segunda, muito solúvel em água da alcalinidade acima referida, apresentou sempre um décimo da atividade da anterior (provas em agar-nutritivo).

Ambas apresentaram forte diminuição de atividade em presença de glicose.

Toxicidade:

As provas de toxicidade efetuadas em camundongos com as duas frações isoladas, permitiram constatar os seguintes resultados:

Fração A — 100% de letalidade com ação rápida (média de sobrevida — 12 minutos) em doses de até 27 mg/Kg de pêso, não sendo investigada a mortalidade com doses menores que a citada acima.

Fração B — Ausência total de letalidade e de quaisquer efeitos nocivos, até doses de 205 mg/Kg de pêso, não sendo investigada a ação de doses maiores.

RESUMO

São apresentados os resultados de um estudo dos antibióticos produzidos por u'a cêpa antagonista de *Streptomyces sp* isolado de solo da região semiárida do interior do Estado de Pernambuco.

Foram isoladas duas frações com ação antifúngica, ambas sofrendo forte diminuição de atividade em presença de glicose.

ZUSAMMENFASSUNG

Dier hier in einem kurz gefasstem Studium ueber zwei Pilzhemmstoffe angefuehrten Ergebnisse, stammen von einem isolierten *Streptomyces*-Stamm eines Bodenmusters der duerren Gegend von Caruaru, Pernambuco — Brasilien.

Es wurden zwei Fraktionen Pilzhemmender Wirkung isoliert, welche eine starke Aktivitaetsverminderung bei Gegenwart von Traubenzucker aufwiesen.

MÉTODO SIMPLES DE EXTRACÃO E PURIFICAÇÃO DA BIFLORINA

Oswaldo Gonçalves de Lima *Ivan Leôncio d'Albuquerque*

O antibiótico denominado *biflorina*, por nós isolado, em 1952, de raízes de *Capraria biflora*, [1)2)] mostrou-se bastante eficaz no tratamento de algumas micoses, em ensaios realizados por Jaldemar Serpa, [*)] razão por que tivemos de suprir quantidades crescentes de substância ativa, por indicação daquele especialista.

O método utilizado para obtenção do antibiótico cristalizado com atividade de 0,28 mcg/ml para *Bacillus subtilis* (9) W está descrito em nossa segunda comunicação da seguinte maneira:

> Seguindo um dos métodos de extração indicado na primeira comunicação, parcialmente modificado, — lográmos obter um produto bastante purificado, da seguinte maneira: a parte exodérmica da raiz da planta, finamente dividida, foi extraída por acetona, até esgotamento completo. A solução acetônica se evaporou a vácuo, até eliminação total do solvente e o resíduo foi tomado por benzeno, filtrando-se em funil de vidro poroso e cromatografando-se em coluna de "Special Filtrol", parcialmente inativada por água. Foi o cromatograma desenvolvido por benzeno puro, que deslocou uma faixa frontal amarela, muito móvel, que percolou

*) — Os trabalhos do Prof. Jaldemar Serpa serão pròximamente publicados nos **Anais** da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife e na Revista Brasileira de Pediatria.

quase totalmente, sem que a faixa ativa, de coloração azul cinza, atingisse o final da coluna. Fêz-se a eluição com acetona, depois de isolada a faixa ativa por corte do bloco. O resíduo obtido da evaporação da solução acetônica correspondeu mais ou menos ao produto da nossa comunicação anterior, com atividade em redor de 0,8 mcg/ml contra *Bacillus subtilis* (9) W.

A solução benzênica (concentrada) dêsse produto tratámo-la, em excesso, por éter de petróleo (P. E. 35--65º C), apresentando abundante precipitado de côr parda, o qual foi retomado por benzeno e reprecipitado, da maneira anterior.

Os líquidos constituídos pelos extratos benzeno-ligroínicos, de côr granada, se cromatografaram em coluna mista de carbonato de cálcio e alumina de Brockman (Standard, Merck), parcialmente desativada, segundo o método de Barua & Morton.

Efetuou-se o desenvolvimento com éter de petróleo, formando-se duas camadas: a superior — ativa, de coloração azul-cinza; e a inferior — amarela, inativa.

Do percolado ativo se cristalizou a Biflorina por concentração da solução e arrefecimento.

Acontece que, durante as duas operações cromatográficas utilizadas no método anterior, observou-se sempre uma perda notável de substância ativa, em conseqüência de sua labilidade em presença de alumina, mesmo quando esta parcialmente desativada.

O método que ora apresentamos tem a vantagem de fornecer com bom rendimento (0,2% da parte exodérmica da raiz sêca ao ar) um produto cristalizado, de elevada atividade antimicrobiana e susceptível de emprêgo na terapêutica.

As operações de que se constitui o mesmo método podem ser assim resumidas:

O extrato acetônico da parte exodérmica das raízes sêcas de *Capraria biflora* é evaporado a sêco (na obscuridade), tratando-se o resíduo por pequena quantidade de benzeno e filtrando-se em seguida. A solução obtida é tratada por éter de petróleo em grande excesso, deixando-se em repouso por algumas horas, à temperatura de laboratório (28º C) e filtrando-se. O filtrado é evaporado a sêco, sendo desagregado o resíduo com pequeno volume de metil-isobutilcetona e filtrando-se ràpidamente, sob sucção. O material sólido é,

depois de sêco, dissolvido na menor quantidade de ácido acético glacial, adicionando-se-lhe, então, água abundante. O precipitado formado constitui-se de biflorina cristalizada que se separa por filtração e lavagem com água. O produto, depois de sêco, apresenta excelente atividade, conforme se pode observar no quadro 1.

QUADRO 1

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DA BIFLORINA OBTIDA SEGUNDO O MÉTODO DESCRITO NO PRESENTE TRABALHO

MICROORGANISMO	Concentração de inibição mcg/ml	
Bacillus subtilis 9	0,3	
B. subtilis 27	0,1	
B. anthracis	0,2	
B. cereus	> 0,2	< 0,4
B. mycoides	> 0,2	< 0,4
Sarcina lutea	0,09	
Micrococcus pyogenes v. *aureus*	0,2	
Streptococcus hemolyticus	> 0,8	< 1,0
Escherichia coli R	> 100	
Brucella suis	0,4	
Br. melitensis	0,8	
Br. abortus	> 10,0	
Candida albicans 50	>> 50	< 70
C. albicans IHM	>> 50	< 70
C. tropicalis	>> 50	< 70
C. pseudotropicalis	> 70	< 100
C. krusei		100
C. parakrusei	> 70	< 100
C. stellatoidea	>> 70	< 100
Candida sp. ME-51	>> 70	< 100
Cryptococcus neoformans ENCB	> 1,0	< 1,5

BIBLIOGRAFIA

1) Gonçalves de Lima, Oswaldo; I. L. d'Albuquerque; P. Loureiro; C. L. Carmona & Zapata Bènard. 1953. Biflorina, novo antibiótico isolado da **Capraria biflora** (**Scrophulariaceæ**). Revista de Química Industrial, n.º 249, ano XXII. Rio de Janeiro.

2) Gonçalves de Lima, Oswaldo; I. L. d'Albuquerque & P. Loureiro. 1953. Novas observações sôbre a Biflorina — antibiótico isolado de **Capraria biflora** L. (**Scrophularinaceæ**). An. Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XI, n.º 1, 3-9.

ESTUDO SÔBRE A NUTRIÇÃO DE *HEMISPORA STELLATA* (*SPORENDONEMA EPIZOUM*)

Orio Ciferri * *Luiz de Albuquerque Araújo* **

INTRODUÇÃO

Uma cêpa de *Hemispora stellata*, isolada pelo prof. Sílvio Campos do couro cabeludo de um paciente afetado de "Tinha", atraíu a nossa atenção pela sua incapacidade de desenvolver-se sôbre meios de cultura contendo fontes inorgânicas de nitrogênio. Devido a incerteza que ainda existe sôbre a posição sistemática dêsse fungo e sôbre sua eventual atividade patogênica (Redaelli e Ciferri, 1934) pareceu-nos interessante um estudo um pouco detalhado sôbre suas exigências nutricionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo, *Hemispora stellata* (IMUR FC. n.º 161) proveio da coleção micológica do Instituto de Micologia desta Universidade *** e era cultivado sôbre meios de Sabouraud.

Das fontes de carbono utilizadas, glicerina e arabinose eram E. Merck "p. a."; citrato de sódio, sacarose e glicose Baker & Adamson "reagent"; manose, rafinose, lactose, maltose, levulose e galactose Coleman and Bell "c. p."; xilose Pfansthiel Chem. Co. "c. p.'.

Os aminoácidos, todos da California Foundation for

* Do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife.
Enderêço atual: National Research Council, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Sask, Canada.
** Do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife.
*** Estamos gratos ao Diretor, Prof. A. Chaves Batista, pelos conselhos dados no curso dessa pesquisa e por haver gentilmente colocado à nossa disposição parte do material bibliográfico.

Biochemical Research, eram em parte na forma levo (cloridrato de arginina, ácido glutâmico, cloridrato de histidina, isoleucina, leucina, cloridrato de lisina, prolina e tirosina), e em parte na forma racêmica (ácido aspártico, alanina, metionina, fenil-alanina, serina, treonina, triptofano e valina). A l-asparagina era da Eastman Kodak, a uréa Mallinkrodt "U. S. P." e a hidroxilamina da E. Merck "p. a". Cloridrato de guanina, cloridrato de glucosamina, glutatione e creatinina da City Chemical Co. Nitrato de sódio, nitrito de sódio e cloreto de amônio da Riedel-de Haen "p. a".

Vitaminas e fatôres de crescimento (cloridrato de tiamina, riboflavina, cloridrato de piridoxina, d-pantotenato de cálcio, niacina, i-inositol, ácido fólico e d-biotina), eram produtos da California Foundation for Biochemical Research "U. S. P.".

Das fontes complexas de nitrogênio Vitamin-free Casamino Acids (CAA) e Bacto-Peptona (BP) eram produtos da Difco enquanto que Trypticase (TPC) e extrato de levedura (EL) eram da B. B. L.

No estudo sôbre a utilização de carboidratos, êstes depois da esterilização por tindalização, eram juntados à concentração de 2% ao meio de Richard modificado *, isento de glucose mas adicionado de 0,2% de Trypticase. Para utilização das fontes de nitrogênio se usou o mesmo meio de Richard, isento de nitrato de potássio e de Trypticase, juntando-se o composto nitrogenado em quantidade tal que desse uma concentração final de 0,2 mg de nitrogênio por ml. Vitaminas e fatôres de crescimento foram juntados ao meio basal de Richard à concentração de 10 mcg/ml (1 mcg/ml para biotina). Para alguns aminoácidos a solução foi neutralizada com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 0,1 N.

A esterilização das soluções assim preparadas era efetuada mediante tratamento em autoclave a 105º C por 20 minutos.

O inóculo era constituído de uma suspensão de esporos em água destilada estéril obtida raspando com alça a superfície da cultura no tubo, centrifugando e lavando três vêzes e então resuspendendo-os em água destilada estéril. Da tal suspensão quantidades equivolumétricas eram usadas para inocular assepticamente os matrazes de cultura.

---

* Composição do meio basal de Richard: glucose 34 g; KNO_3 10 g; KH_2PO_4 5 g; $MgSO_4$ 2,5 g; $FeSO_4$ traços; água 1000 ml.

Depois da inoculação, as culturas (25 ml em matrazes de 125 ml) eram colocadas sôbre um "shaker" rotatório por 7 dias, à temperatura ambiente (25º-28º C).

A determinação do crescimento se efetuava filtrando o micélio de cada matraz sôbre filtro (C. Scheicher & Schull) precedentemente tarado. O micélio era lavado com água destilada, secado por 12 horas a 80º C. Depois de sêco, o filtro era esfriado à temperatura ambiente em dessecador (com cloreto de cálcio) e então pesado ao décimo de miligramo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As experiências preliminares, conduzidas sôbre vários meios sólidos de uso em microbiologia (Sabouraud, Czapek, Emerson, batata-glucose, Richard etc.), confirmaram a incapacidade de *H. stellata* de desenvolver-se sôbre meios contendo nitrato de sódio como única fonte de nitrogênio. O desenvolvimento era por um outro lado rápido e abundante nos meios contendo compostos nitrogenados orgânicos e vitaminas, como extrato de levedura, peptona, extrato de carne etc.

Uma confirmação dêsses resultados se obteve com culturas líquidas contendo fontes inorgânicas de nitrogênio ou fontes orgânicas ou ainda misturas de umas e de outras (Quadro I). *H. stellata* não se desenvolveu em meios con-

QUADRO I

Crescimento em presença de fontes simples e complexas de nitrogênio

Fontes de nitrogênio juntadas ao meio basal de Richard *	Pêso de micélio sêco (em mg) **	Incremento sôbre o testemunho (%)
nitrato de sódio (test.) . .	4	—
cloreto de amônio . . .	6	15,0
nitrito de sódio	4	0,0
E. L.	11	27,5
E. L. + nitrato de sódio .	19	47,5
TPC	47	117,5
TPC + nitrato de sódio .	63	157,5
CAA + nitrato de sódio .	38	95,0

* Meio basal de Richard sem nitrato: nitrato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de amônio e extrato de levedura (EL) juntados à concentração de 0,1%; Trypticase (TPC) e casaminoácidos (CAA) a 0,2%.

** Cada dado, arredondado ao miligramo, é a média de dois valores

tendo nitrato de sódio, nitrito de sódio e bem escassamente sôbre meio contendo cloreto de amônio.

Os resultados obtidos com cloreto de amônio, considerados comparativamente com os incrementos obtidos nos meios com nitrogênio orgânico, podem-se considerar quase insignificantes. O desenvolvimento em presença de hidrolisado de caseína isento de vitaminas indicava que a incapacidade do fungo de desenvolver-se sôbre meios simples não era devida, como à primeira vista se poderia pensar, a uma deficiência vitamínica. No máximo tratava-se de uma deficiência vitamínica do tipo parcial; tais deficiências, muito comuns entre microorganismos, podem ser superadas juntando-se aos meios hidrolisados proteínicos ou misturas de aminoácidos.

Uma tal hipótese era em parte confirmada pelos resultados obtidos nas associações nitrogênio inorgânico + complexos nitrogenados orgânicos dado que estas associações deram incrementos maiores do que aqueles obtidos nos meios contendo sòmente complexos orgânicos nitrogenados, o que fazia supor que os sais inorgânicos, quando não usados isoladamente, poderiam ser utilizados.

Antes de nos aprofundarmos neste aspecto da nutrição de *H. stellata* pareceu-nos preliminar uma indagação sôbre as exigências nutricionais no que dizia respeito às fontes de carbono. Para tal o fungo era cultivado em meio de Richard, modificado nas fontes de carbono, e adicionado de 0,2% de Trypticase (Quadro II).

QUADRO II

Utilização das fontes de carbono

Fontes de carbono juntadas ao meio de Richard *	Pêso de micélio sêco (em mg) **	Incremento sôbre o testemunho (%)
nenhuma (test.)	8	—
glucose	27	33,7
rafinose	26	32,5
sacarose	24	30,0
glicerina	24	30,0
frutose	20	25,0
manose	20	25,0
maltose	20	25,0

CONTINUAÇÃO

Fontes de carbono juntadas ao meio de Richard *	Pêso do micélio sêco (em mg) **	Incremento sôbre o testemunho (%)
galactose	11	13,7
lactose	8	—
arabinose	8	—
citrato de sódio	6	—
xilose	5	—

Glucose, sacarose e rafinose foram os carboidratos que estimularam mais o crescimento seguidos de frutose, manose e maltose. A galactose, por outro lado, se revelou como fonte de carbono ineficiente enquanto que lactose e as pentoses arabinose e xilose não foram absolutamente utilizadas. As melhores fontes de carbono (glucose, sacarose e rafinose), apesar da diversidade de estruturas, possuem uma notável afinidade: a sacarose é hidrolisada em glucose e frutose pelo mesmo enzima (β — frutosidase) que catalisa a hidrólise da rafinose em frutose e melibiose. A melibiose por sua vez é fàcilmente hidrolisada em glucose e galactose por um enzima muito comum entre os microorganismos, a β — galactosidase (é interessante notar como *H. stellata* parece não conter a α — galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose). Dos compostos de estrutura não glucídica, a glicerina foi utilizada muito bem enquanto que o citrato de sódio se revelou como fonte de carbono ineficiente. Portanto, no que diz respeito às fontes de carbono, o fungo não apresentou nenhuma anomalia, comportando-se nas suas exigências como a maioria dos microorganismos.

Na experiência seguinte se utilizou o meio normal de Richard contendo glucose e nitrato de potássio, juntando-se vitaminas, fatôres de crescimento e fontes nitrogenadas complexas, isentas ou não de vitaminas (Quadro III).

* Meio de Richard sem glucose, adicionado de 0,2% de Trypticase; fontes de carbono juntadas à concentração de 1%.

** Cada dado, arredondado ao miligramo, é a média de três valores.

QUADRO III

Influência das vitaminas, fatôres de crescimento e fontes nitrogenadas complexas

Composto adicionado ao meio de Richard *	Pêso do micélio sêco (em mg) **	Incremento sôbre o testemunho (meio de Richard = 100)
nenhum (testemunho) . .	17	100
TPC	39	229
BP	32	176
CAA	26	152
EL	24	141
niacina	20	117
piridoxina	20	117
pantotenato de cálcio . .	20	117
ácido fólico	20	117
riboflavina	19	111
inositol	14	83
tiamina	14	83
biotina	13	76
mistura das 8 vitaminas .	13	76

É evidente portanto que o efeito das vitaminas e dos fatôres de crescimento foi absolutamente nulo (os incrementos que alguns dêstes deram sôbre o testemunho são, a nosso ver, não significativos mas devidos a variabilidade dos dados experimentais desde que a mistura das vitaminas se mostrou ineficaz). A ineficácia das vitaminas está em contraposição, como já foi visto pelos experimentos precedentes, ao efeito altamente estimulante de fontes nitrogenadas complexas. Caíu assim a hipótese de uma deficiência vitamínica, ainda que parcial; o comportamento do fungo indicava a necessidade, para seu desenvolvimento, de alguma fonte orgânica nitrogenada mas não de nenhuma das vitaminas ou fatôres de crescimento.

Foi como conclusão decidido estudar o efeito das fontes de nitrogênio sôbre o crescimento do fungo, juntando-as,

* Meio de Richard com TPC, BP, EL e CAA juntados à concentração de 0,2%; biotina, à concentração de 1 mcg/ml; outras vitaminas: 10 mcg/ml.

** Cada dado, arredondado ao miligramo, é a média de três valores.

em quantidades estequiométricas, ao meio basal de Richard sem nitrato (Quadro IV).

QUADRO IV

Utilização das fontes de nitrogênio

Fontes de nitrogênio juntadas ao meio basal de Richard *	Pêso do micélio sêco (em mg) **	Incremento sôbre o meio com TPC (= 100)
nenhuma (testemunho) .	3	12
1.º grupo:		
guanina	91	364
ácido glutâmico	89	356
uréia	76	304
glutatione	45	180
cloreto de amôneo . . .	38	154
Trypticase (TPC) . . .	25	100
2.º grupo:		
lisina	23	92
ácido aspártico	20	80
prolina	19	76
leucina	18	72
isoleucina	18	72
fenil-alanina	17	68
arginina	17	68
asparagina	16	64
3.º grupo:		
glicina	13	52
valina	11	44
triptofano	11	44
4.º grupo:		
nitrato de sódio	8	32
serina	7	28
treonina	5	20

CONTINUAÇÃO

Fontes de nitrogênio juntadas ao meio basal de Richard *	Pêso do micélio sêco (em mg) **	Incremento sôbre o meio com TPC (= 100
hidroxilamina	5	20
metionina	4	16
alanina	3	12
nitrito de sódio	3	12
creatina	3	12
glucosamina	2	8

Como se observa o comportamento de *H. stellata* é muito peculiar. Sôbre quase trinta compostos provados sòmente cinco deram resultado superior a aquêle obtido no meio contendo Trypticase. É interessante notar que êstes cinco compostos são um sal inorgânico (o cloreto de amônio), um aminoácido (o ácido glutâmico), um peptídeo (o glutatione), uma base purínica (a guanina) e uma amida (a uréia).

A êste primeiro grupo segue um segundo, constituído pelos compostos que estimularam o crescimento de maneira evidente, mas não superior ao valor obtido com a Trypticase; dêste segundo grupo fazem parte só aminoácidos de estrutura relativamente complexa (lisina, ácido aspártico, prolina, leucina, isoleucina, fenil-alanina, arginina e asparagina). Três outros aminoácidos (glicina, triptofano e valina) deram resultados fracos podendo-se no entanto reconhecer significativamente superiores a aquêles obtidos sôbre o testemunho de nitrato. As restantes fontes de nitrogênio (quarto grupo), foram pràticamente ineficazes, podendo sua utilização ser considerada nula.

Difícil uma discussão dos resultados obtidos se se considera a diferença estrutural existente entre os compostos considerados fontes ótimas de nitrogênio. Não obstante, é possível tentar alguma dedução. Uma primeira é que *H. stellata* possui uma preferência pelos substratos contendo amônea ou dos quais possa fàcilmente obtê-la: uréia e cloreto de amôneo estão entre as fontes ótimas podendo-se juntar aqui talvez a guanina. Esta base, que nos animais superiores é metabolizada via xantina e ácido úrico, nos microorganismos parece seguir uma outra via, mediante

* Meio de Richard sem nitrato; fontes de nitrogênio juntadas à concentração de 0,2 mg de nitrogênio por ml.

** Cada dado, arredondado ao miligramo, é a média de três valores.

conversão em alantoína e dêste composto a uréia ou ainda diretamente a amônea e anidrido carbônico.

No caso da guanina será provàvelmente interessante um estudo mais detalhado; a ótima utilização de *H. stellata* faz pressupor que êste composto tenha um papel de primeiro plano nos processos vitais do fungo e assim mais que simples fonte de nitrogênio interfira em qualquer outro processo (talvez incorporando-se diretamente na síntese dos ácidos nucleicos).

Os resultados obtidos com o ácido glutâmico podem ser fàcilmente explicados pela importância que êste aminoácido tem nos processos vitais dos micróbios, funcionando quase como anel de junção entre o metabolismo dos carboidratos e o das proteínas. Anàlogamente, explica-se a ótima utilização do glutatione, um tripeptídeo cujo primeiro grau de hidrólise dá formação de ácido glutâmico e de cistinilglicina. A metabolização do ácido glutâmico, considerando os resultados obtidos no meio contendo ácido aspártico, pareceria ser mais por deaminação (e então com liberação de amônea) que por transaminação.

Os resultados obtidos com a lisina (um aminoácido por nós incluído no segundo grupo mas que deu resultados pràticamente iguais àqueles da Trypticase) poderiam assim ser explicados com uma conversão a ácido glutâmico mediante uma dupla deaminação a ácido α — cetoadípico e transformação em ácido glutárico.

Mais difíceis de explicar são os resultados obtidos, por exemplo, com ácido aspártico, homólogo do ácido glutâmico, e com a arginina, aminoácido tão importante no ciclo da uréia e que pode ser diretamente metabolizado em uréia e ornitina por um processo comum em muitos microorganismos. Deixaram-nos perplexos ainda os resultados obtidos com os aminoácidos monoaminomonocarboxílicos de cadeia linear e de estrutura mais simples que se pressuporia fôssem fàcilmente utilizados. *H. stellata* ao contrário, utiliza escassamente a glicina, não utiliza os homólogos superiores alanina, serina e treonina (com cadeias de 3-4 átomos de carbono) enquanto que utiliza discretamente bem as cadeias ramificadas de 4 a 6 átomos de carbono da valina, leucina e isoleucina.

CONCLUSÕES

Nossas observações confirmam os resultados de Arêa Leão e Cury (1950) no que diz respeito a ausência de uma

deficiência vitamínica em *H. stellata*; no entanto o fungo se desenvolveu muito pouco em meios contendo asparagina como única fonte de nitrogênio enquanto que os autores e também Koenigsbauer (1951) obtiveram bom crescimento sôbre meios contendo êste composto. Tal fato parece-nos provàvelmente devido a variabilidade entre uma cêpa e outra; também um de nós (Montemartini e Ciferri, 1956) estudou uma cêpa de *H. stellata* que se desenvolvia òtimamente sôbre meio contendo ácidos glutâmico ou aspártico, muito pouco sôbre meio contendo nitrato de sódio e não se desenvolvia sôbre meio contendo sulfato de amônio.

Do ponto de vista nutricional, *H. stellata*, não apresenta anomalia em relação às fontes de carbono, tendo no entanto um comportamento muito interessante na assimilação dos compostos nitrogenados. Subministrados individualmente, sòmente cinco compostos estimularam o crescimento de maneira superior ao testemunho, constituído de um hidrolisado de proteínas: êstes cinco compostos, se se excetua a afinidade entre ácido glutâmico e glutatione, seja estruturalmente, seja funcionalmente, são tão distantes um do outro que estimulariam a realização de um estudo mais detalhado sôbre o assunto.

RESUMO

Os autores apresentam os resultados de estudo sôbre a nutrição de *Hemispora stellata* (*Sporendonema epizoum*). O fungo não apresenta nenhuma deficiência vitamínica, nenhuma anomalia em relação à utilização de fontes de carbono tendo, no entanto, um comportamento muito interessante no que tange à assimilação de nitrogênio. Dentre 30 compostos testados sòmente 5 deram um estímulo de crescimento considerável: cloreto de amôneo, guanina, uréia, ácido glutâmico e glutatione.

SUMMARY

A study of the nutritional requirements of *Hemispora stellata* (*Sporendonema epizoum*) revealed that the fungus did not possess any vitamin deficiency although it was unable to grow on chemically defined media containing nitrites or nitrates as sole nitrogen source. Of about thirty different nitrogen compounds tested, *H. stellata* utilized to a considerable extent only guanine, ammonium chloride, glutamic acid, glutathione and urea thus suggesting a certain

specificity for substrata containing ammonium or from which ammonium could be readily obtained.

BIBLIOGRAFIA

ARÊA LEÃO DE, A. E. e CURY, A. — Deficiências vitamínicas de cogumelos patogênicos. **Mycophatologia, 5**, 65-90 (1950).

KOENIGSBAUER, H. — Uber die Wirkung schwefelhaltiger Aminosaüren auf das Wachstum verschiedener Fadenpilze "in vitro". **Mycopathologia, 5**, 173-177 (1951).

MONTEMARTINI, A. e CIFERRI, O — Gli aminoacidi come fonte di azoto nella crescita dei funghi. **Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia**, s. V, **14**, 1-22 (estr.) (1956).

REDAELLI, P. e CIFERRI, R. — Studio comparativo di ventun ceppi di **Sporendonema epizoum** (Corda) Nobis (= **Hemispora stellata** Vuillemin; **Oospora d'Agatæ** Saccardo; ecc.). **Atti. Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia**, s. IV, **5**, 145-198 (1934).

SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS NA CANAFÍSTULA (*CASSIA EXCELSA* SCHRAD)

I. Cassilisina, um novo alcalóide com ação antibiótica

Oswaldo Gonçalves de Lima *Ivan Leôncio d'Albuquerque*
Marisa Pinheiro Machado *Gerson Pereira Pinto*

(Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife)

No curso dos nossos trabalhos de pesquisa de substâncias antimicrobianas em plantas superiores, realizados no *Instituto de Antibióticos* da *Universidade do Recife*, foi observado que extratos aquosos de cascas de caules e de raízes de "canafístula" (*Cassia excelsa* Schrad) apresentavam forte atividade contra germes Gram-positivos e ácido-resistentes, notando-se, ademais, u'a notável ação lisante em cultivos de *Bacillus subtilis*.

Sob a designação vulgar de "canafístula", apontam-se na região do Nordeste, pelo menos, nove espécies de leguminosas cesalpinióideas e mimosóideas, incluindo-se os gêneros *Cassia*, *Swartzia* e *Pithecolobium*. [1]

A espécie, objeto do nosso estudo, vegeta, segundo Andrade Lima, [2] em vasta zona do agreste pernambucano, sendo sua área de dispersão — de acôrdo com R. Braga — muito mais ampla, pois abrange vários estados da República, inclusive São Paulo e Mato Grosso (*loc. cit.*).

Acêrca do emprêgo dessa canafístula na medicina popular, nada encontramos, até agora, que se pudesse relacionar com as propriedades antimicrobianas por nós observadas.

Durante os nossos primeiros ensaios de isolamento do

agente antimicrobiano em os extratos aquosos e etanólicos das raízes e das cascas do caule da referida leguminosa, logo constatamos que algumas frações ativas apresentavam evidentes características de alcalóide. Também lográmos distinguir a existência de outro antibiótico com atividade notadamente superior à do alcalóide anteriormente mencionado e cujo estudo é objeto de outra comunicação inserida nesta mesma revista.

Restringe-se o presente estudo aos dados que havemos colhido, até agora, acêrca de um alcalóide que denominámos *cassilisina*, em razão de sua evidente ação lítica contra germes sensíveis, fato já constatado com outro alcalóide antibiótico, a *cefarantina*, de *Stephania cepharantha* Hayata (*Menispermaceæ*).[3)]

Isolamento e propriedades do antibiótico

Na primeira fase de extração da substância ativa, foi utilizado o método de Stas-Otto, em suas linhas gerais, operando-se sempre nas condições térmicas mais suaves e evitando-se, por todos os meios, possibilidades de oxidação nas diversas operações, até a obtenção do extrato etéreo contendo o alcalóide impuro, em forma de base livre.

O resíduo da evaporação da solução etérea, dissolvido no menor volume de metanol e acidificado por ácido clorídrico até pH próximo de 1, foi tratado por água até início de precipitação, deixando-se em refrigerador (a 5º C) durante várias horas. O abundante precipitado, separado por filtração e lavagem com água fria, foi dessecado a vácuo e logo dissolvido no menor volume de metanol, tratando-se em seguida por acetona até turvação e, ao final, por éter de petróleo em grande excesso, com formação de sólido flocoso que se separou por filtração e se lavou com u'a mistura de acetona & ligroína, repetindo-se a dissolução e precipitação até que o líquido sobrenadante se apresentou incolor. O precipitado foi, finalmente, submetido a repetidas cristalizações em etanol absoluto, logrando-se um produto microcristalino (Figs. 1, 2 e 3) com atividade de 70-80 mcg/ml para *Bacillus subtilis* e 30 mcg/ml para *Mycobacterium phlei*, de pf. 155,8º-157,5º C para o cloridrato e 271º C para o sulfato; bastante solúvel em metanol, moderadamente solúvel em piridina, pouco solúvel em água, etanol, acetona, butanol normal, acetato de etila, éter etílico, clorofórmio, benzeno e éter de petróleo. Observou-se, ademais, que a subs-

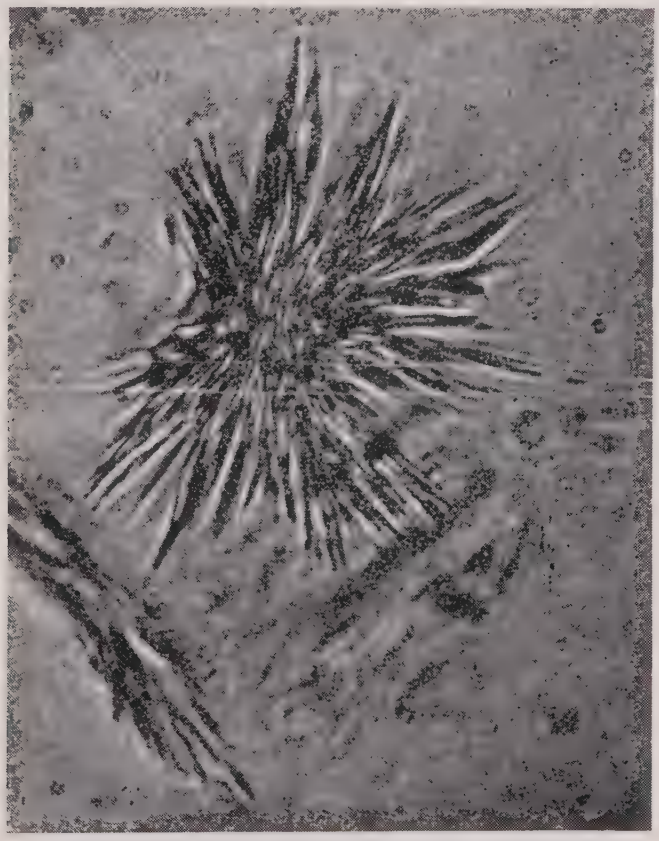


Fig. 1

Cristais de cloridrato de cassilisina, obtidos de solução em mistura metanol-água. Orig. ca. 1.000 x.

tância é bastante solúvel na mistura água-acetona (1:1).

Em extrações ulteriores, realizadas em novas amostras da mesma espécie vegetando na região do agreste (Pesqueira e Mimoso), usou-se para isolamento e purificação da substância ativa o esquema constante do quadro I.

Reações

O produto apresentou reações positivas para os principais reagentes de precipitação de alcalóide, tais como ácido

pícrico, ácido sílico-túngstico, sal de Reinecke, e os reativos de Mayer e de Wagner. Negativas, as provas com ácido tânico, Orange II e heliantato. Com o reativo de Froehde, desenvolve-se u'a coloração azul que passa ao pardo, ao

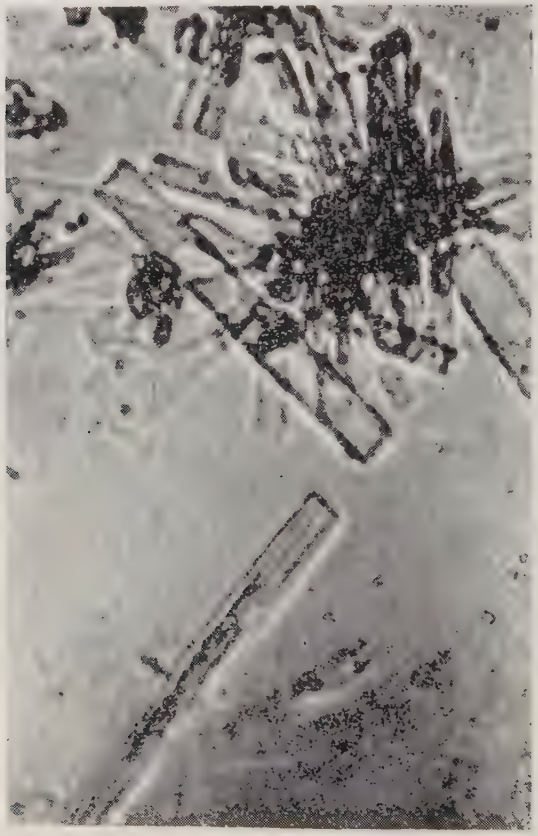


Fig. 2

Cristais de cloridrato de cassilisina, obtidos de solução em n.butanol. Orig. 700 x.

vermelho bonina e, pelo aquecimento, ao marron. Com o reativo de Erdmann, produz-se u'a coloração amarela citrina. Com o de Mandelin e com o de Marquis, verificam-se, respectivamente, colorações vermelha viva e amarela canário.

Observou-se na amostra a presença de cloro iônico, encontrando-se ainda um teor de nitrogênio (Micro-Kjeldahl) no valor aproximado de 8,5% (uma única determinação).

Fig. 3

Mesma amostra da fig. 2. Orig. 500 x.

Espectro antimicrobiano "in vitro"

A atividade da cassilisina é apresentada no quadro II, no qual se lhe pode apreciar ação preponderante contra espécies dos gêneros *Candida*, *Mycobacterium* e *Brucella*. É de salientar-se o fato, anteriormente assinalado, de possuir a cassilisina forte ação lítica contra *B. subtilis*, não se

observando tal fenômeno, entretanto, com espécies do gênero *Mycobacterium* (*M. phlei* e *M. tuberculosis*).

Toxidez

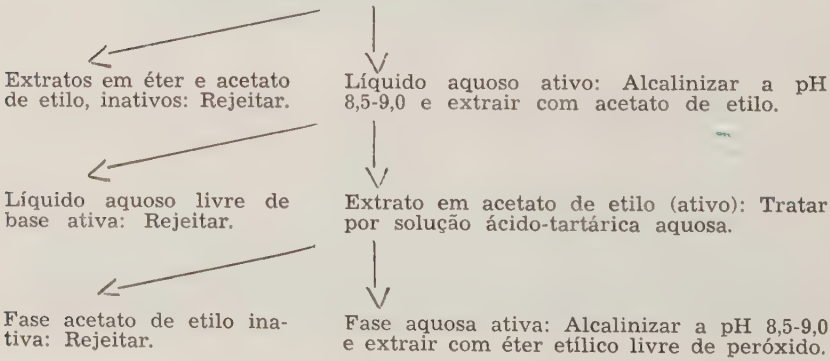
Com o cloridrato de cassilisina (cristalizado e ativo) foram procedidas provas de toxidez em camundongos, por via subcutânea. A substância não provocou qualquer sinal de intolerância nos referidos animais, até doses de 300 mg/kg pêso vivo.

Alcalóides antibióticos e Cassilisina

Skinner, [4] em uma revisão recente dos antibióticos de plantas superiores, destaca os principais alcalóides conhecidos como antimicrobianos. É de considerar-se em primeiro lugar, no caso presente, o alcalóide denominado *chaksina*, obtido, em 1949, por Mazhar-Ul-Haque [5] das sementes de *Cassia absus*. A *chaksina* distingue-se da cassilisina não sòmente pelo ponto de fusão do seu sulfato como principalmente pela propriedade lítica da segunda e sua ação contra espécies dos gêneros *Brucella*, *Mycobaterium* e *Candida*.

QUADRO I

O xarope ácido (tartárico) do alcalóide — obtido por evaporação a frio do extrato hidro-alcoólico ácido original, segundo o método de Stas Otto — foi diluído com água e tratado repetidamente com éter etílico e, logo a seguir, com acetato de etilo, até esgotamento.



Fase aquosa esgotada: Rejeitar.

Extrato etéreo contendo alcalóide e apresentando atividade antibiótica: Evaporar, a secura. Dissolver o resíduo em metanol. Adicionar ácido pícrico e juntar água em grande excesso. Deixar em refrigerador.

Sobrenadante decantado: Rejeitar.

Precipitado: Dissolver em pequeno volume de metanol. Arrefecer até 5º C e acidular com ácido clorídrico. Adicionar acetona e ligroína, até precipitação de uma substância pardo-avermelhada. Deixar em repouso. Decantar.

Precipitado pardo-avermelhado ativo (outro alcalóide ativo?): Rejeitar.

Sobrenadante: Adicionar mais ligroína até formação de precipitado branco. Deixar em refrigeração por algumas horas. Separar o precipitado por filtração. Dissolvê-lo em metanol; tratar a solução por carvão ativo e filtrar.

Carvão: Rejeitar.

Filtrado: Deixar em geladeira até precipitação. Filtrar e lavar o precipitado com metanol frio.

Filtrado: Rejeitar.

Precipitado: Dissolver no menor volume de metanol e diluir com água em grande excesso. Deixar em refrigeração (5º C) durante algumas horas. Filtrar o produto cristalino.

Filtrado: Rejeitar.

Precipitado cristalino (PF: 146-148º C): Dissolver em etanol e tratar por acetona, a baixa temperatura. Filtrar o precipitado.

Filtrado: Rejeitar.

Precipitado: Dissolver em pequeno volume de metanol e diluir com água até turvação. Deixar em geladeira (5º C). Filtrar.

Filtrado: Rejeitar.

Precipitado cristalino (PF: 155,5º-157º C): Atividade contra **B. subtilis**: 100-150 mcg/ml; Atividade contra **M. phlei**: 40-60 mcg/ml.

QUADRO II

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DA CASSILISINA

MICROORGANISMOS PROVADOS	Concentração de inibição mcg/ml	
Bacillus subtilis 9	> 160	< 180
B. anthracis	> 140	< 160
B. mycoides	> 200	
Micrococcus pyogenes v. *aureus*	> 200	
Streptococcus hemolyticus	> 140	< 160
Diplococcus pneumoniæ	> 40	< 60
Escherichia coli R	> 200	
Shigella paradysenteriæ	> 200	
Salmonella typhosa	> 200	
Klebsiella pneumoniæ	> 140	< 160
Proteus vulgaris	> 200	
P. morganii	> 200	
Brucella suis	> 20	< 30
Br. melitensis	> 30	< 40
Br. abortus	> 30	< 40
Pseudomonas aeruginosa	> 200	
Mycobacterium phlei	> 30	< 40
Myc. smegmatis	> 30	< 40
Myc. tub. var. *hom.*	> 20	< 30
Nocardia asteroides	> 80	< 100
Candida albicans IBB-50	> 30	< 40
C. albicans IHM	> 100	< 120
C. krusei	> 30	< 40
C. tropicalis	> 80	< 100
C. pseudotropicalis	> 20	< 40
C. stellatoidea	> 20	< 40
C. parakrusei	> 20	< 40

Outro alcalóide antibiótico — a cefarantina —, existente em *Stephania cepherantha* (*Menispermaceæ*) e descoberto por Kondo & colaboradores (*loc. cit.*), possui ação lítica contra *Mycobacterium tuberculosis*, o que não ocorre à cassilisina.

Quanto à *reína*, isolada por Robbins *et al.* [6] de *C. reticulata*, é uma substância acídica (4,5-dihidroxiantraquino-

na-2-carboxílico), quìmicamente distinta, por conseguinte, da cassilisina.

RESUMO

Os autores apresentam um estudo sôbre um alcalóide isolado de *Cassia excelsa* Schrad, com ação antibiótica e uma interessante atividade lítica contra *Bacillus subtilis*.

A cassilisina, nome conferido ao novo antibiótico, foi obtida em forma de cloridrato cristalizado, revelando-se particularmente ativa contra espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Brucella* e *Candida*.

O antibiótico — tanto por seu espectro *in vitro* como por sua propriedade lítica — difere da cefarantina, isolada por Kondo *et al.* (1940) da *Stephania cepherantha* (*Menispermaceæ*) e do outro alcalóide antibiótico, chaksina, existente em *Cassia absus* (Mazhar-Ul-Haque, 1949).

Quanto ao antibiótico de nome reína (ácido cássico), isolado por Robbins *et al.* (1947), é quìmicamente diferente da cassilisina.

Nas provas preliminares de toxidez foi constatada perfeita tolerância por camundongos de doses até 300 mg/kg pêso vivo, por via subcutânea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) BRAGA, RENATO: Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. **Bibl. Divulg. e Cult.** II: 114-116, 1953.
2) ANDRADE LIMA, D.: Estudo fitogeográfico de Pernambuco. **I. P. A.** II: 30, 1957.
3) KONDO, YAMASHITA, KEIMATSU: **J. Pharm. Soc. Japan 54**, 108, 1934; KONDO, H., S. HASEGAWA AND M. TOMITA: U. S. Patent No. 2,206,407, July 2, 1940.
4) SKINNER, F. A.: Antibiotics. **Mod. Meth. der Pflanzenanalyse.** III: 714, 1955.
5) MAZHAR-UL-HAQUE: **Pakistan J. Sci. Research 1**, 91-5, 1949; **Medicus 2**, 22, 1951. **Fide.** Skinner. **loc. cit.**
6) ROBBINS, W. J., F. KAVANAGH AND J. D. THAYER: **Bull. Torrey. Bot. Club. 74**, 287 (1947) **fide Skinner**, F. A. **Mod. Meth. der. Pflanzenanal.** III: 668 (1955).

SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS NA CANAFÍSTULA (*CASSIA EXCELSA* SCHRAD)

II. Cassilisidina, um antibiótico de ação bacteriolítica

Crio Ciferri * *Marisa Pinheiro Machado*

Luiz de Albuquerque Araujo

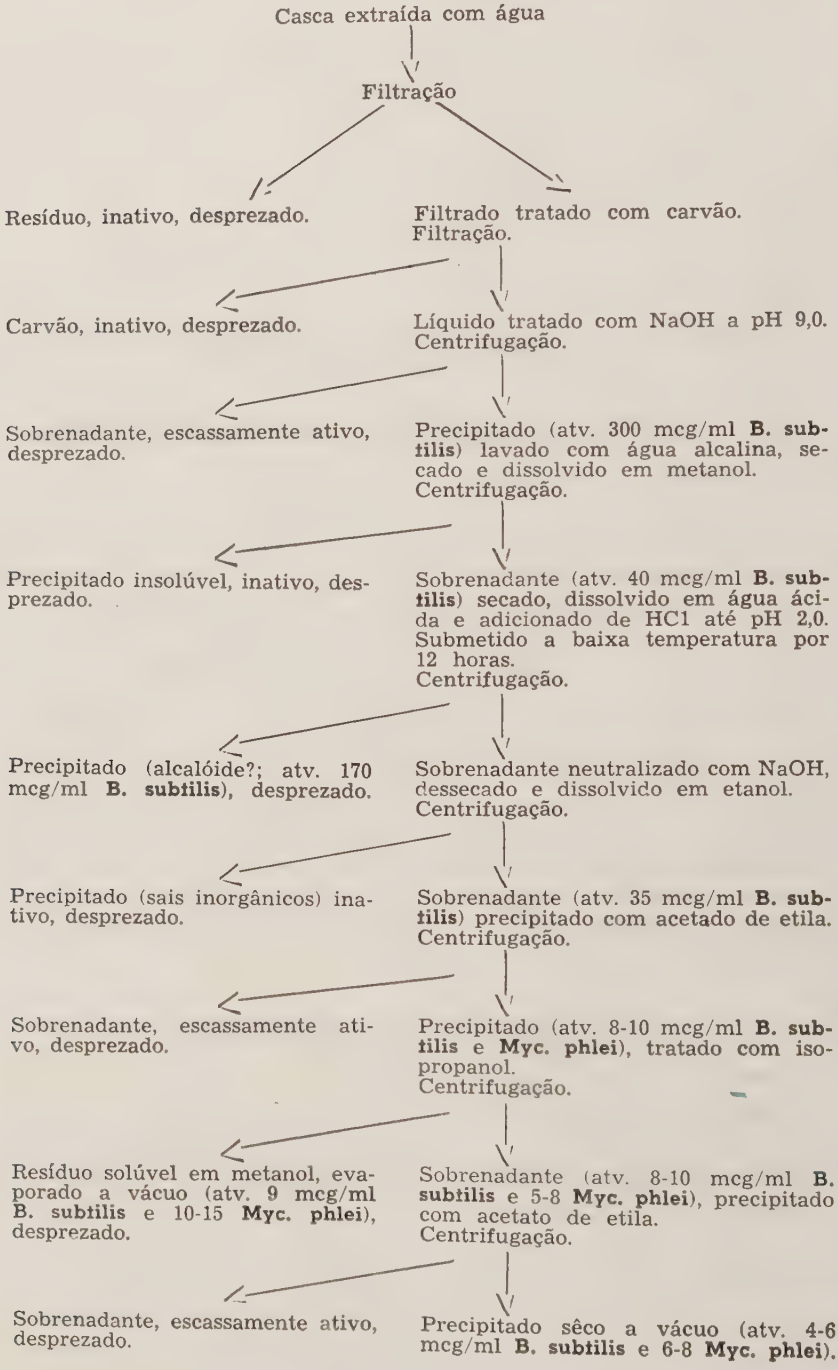
(Do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife)

No trabalho apresentado páginas atrás, nesta revista, sob o mesmo título, (I), é estudado um novo alcalóide de ação antibiótica a que os autores denominaram cassilisina. Como se afirma naquêle artigo, nos extratos aquosos e etanólicos das raízes e das cascas do caule da "*canafístula*" conseguiu-se caracterizar a existência de outro antibiótico, com atividade bastante superior à do alcalóide cassilisina. Considerando a notável ação lítica apresentada por essa substância contra algumas bactérias — notadamente *Bacillus subtilis* e *Sarcina lutea* — os autores deram-lhe o nome de *cassilisidina.*

ISOLAMENTO DO ANTIBIÓTICO

Para obtenção do princípio ativo a casca do caule e das raízes da planta é triturada, suspensa em água e submetida a agitação durante 72 horas aproximadamente. O processo de purificação segue o esquema abaixo:

* Enderêço atual: National Research Council, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Sask, Canada.


Casca extraída com água
Filtração
Resíduo, inativo, desprezado.
Filtrado tratado com carvão.
Filtração.
Carvão, inativo, desprezado.
Líquido tratado com NaOH a pH 9,0.
Centrifugação.
Sobrenadante, escassamente ativo, desprezado.
Precipitado (atv. 300 mcg/ml B. subtilis) lavado com água alcalina, secado e dissolvido em metanol.
Centrifugação.
Precipitado insolúvel, inativo, desprezado.
Sobrenadante (atv. 40 mcg/ml B. subtilis) secado, dissolvido em água ácida e adicionado de HC1 até pH 2,0. Submetido a baixa temperatura por 12 horas.
Centrifugação.
Precipitado (alcalóide?; atv. 170 mcg/ml B. subtilis), desprezado.
Sobrenadante neutralizado com NaOH, dessecado e dissolvido em etanol.
Centrifugação.
Precipitado (sais inorgânicos) inativo, desprezado.
Sobrenadante (atv. 35 mcg/ml B. subtilis) precipitado com acetado de etila.
Centrifugação.
Sobrenadante, escassamente ativo, desprezado.
Precipitado (atv. 8-10 mcg/ml B. subtilis e Myc. phlei), tratado com isopropanol.
Centrifugação.
Resíduo solúvel em metanol, evaporado a vácuo (atv. 9 mcg/ml B. subtilis e 10-15 Myc. phlei), desprezado.
Sobrenadante (atv. 8-10 mcg/ml B. subtilis e 5-8 Myc. phlei), precipitado com acetato de etila.
Centrifugação.
Sobrenadante, escassamente ativo, desprezado.
Precipitado sêco a vácuo (atv. 4-6 mcg/ml B. subtilis e 6-8 Myc. phlei).

A fração bruta, assim isolada, é fàcilmente solúvel n'água, metanol e etanol. Discretamente solúvel em isopropanol, muito pouco ou nada nos demais solventes orgânicos. Cromatografada sôbre papel (método ascendente, solvente *n*-butanol/ac. acético/água, 80:20:20 v/v), o princípio ativo revela-se constituído de uma só mancha com Rf 0,85 —0,90, ativa contra *B. subtilis*, e reação ninhidrina negativa. A maioria das impurezas presentes nessa preparação bruta é constituída de substâncias ninhidrina positivas (Rf 0,2 — 0,4) biològicamente inativas.

Utilizando-se a fácil separação cromatográfica do antibiótico, tentamos a purificação por êsse processo sôbre coluna de alumina e de celulose. Apesar de se ter obtido com relativa facilidade um fracionamento em coluna, a subseqüente eluição deu preparações com atividade antibiótica muito fraca, o que faz supor ser o antibiótico inativado quando submetido a êsse processo.

O espectro de atividade *in vitro* é descrito no quadro anexo:

ESPECTRO ANTIBIÓTICO IN VITRO DA CASSILIDISINA

MICROORGANISMO	mcg/ml	
Bacillus subtilis 9	> 4	< 6
B. subtilis 27	> 20	< 25
B. anthracis	>100	
B. cereus	>100	
B. mycoides	>100	
Micrococcus pyogenes v. *aureus*	> 12	< 15
Streptococcus hemolyticus	> 30	< 40
Str. beta-hemolyticus	> 50	< 80
Sarcina lutea	2	
Diplococcus pneumoniæ	> 14	< 15
Escherichia coli R.	>100	
Erwinia carotovora	>100	
Salmonella typhosa	>100	
Shigella paradysenteriæ	>100	
Klebsiella pneumoniæ	>100	
Proteus morganii	>100	
P. vulgaris	>100	
Pseudomonas aeruginosa	>100	
Brucella suis	> 80	<100
Br. melitensis	> 80	<100
Br. abortus	> 80	<100

Corynebacterium diphteriæ	> 0,8	< 1
Mycobacterium tuberculosis v. *hom.*	> 8	< 10
Myc. phlei	> 6	< 8
Myc. smegmatis	> 8	< 10
Nocardia asteroides	> 10	< 12
N. erythropolis	> 8	< 10
N. brasiliensis	> 4	< 6
N. convoluta	> 10	< 12
Candida albicans	>100	
C. krusei	>100	
Criptococcus neoformans	> 80	<100
Aspergillus niger	>100	
Fusarium equisetii	>100	
Trichophyton tonsurans	>100	
Colletothricum gossypii	>100	
Mucor oblongisporus	>100	

Como já foi dito o antibiótico possue notável atividade lítica contra *B. subtilis* e *Sarcina lutea.*

Quer seja pelo espectro ou método de extração, revela-se que cassilisidina difere do ácido cássico (rheína), isolado por ROBBINS *et al.* (1947) [1] de uma outra espécie de *Cassia, C. reticulata,* e da cassilisina isolada por LIMA *et al.* (1957) de *C. excelsa.*

TOXIDEZ

Da preparação bruta foram efetuadas provas preliminares de toxidez em camundongos, por via subcutânea.

O antibiótico apresentou-se tóxico em doses de 150 mg/Kg pêso vivo, não se observando qualquer intolerância em doses de 100 mg/Kg pêso vivo.

RESUMO

Continuando a pesquisa de substâncias antimicrobianas da Canafístula (*Cassia excelsa* Schrad) os autores apresentam, neste artigo, o estudo de um novo antibiótico que se distingue por uma forte ação lítica contra algumas bactérias, notadamente *Bacillus subtilis* e *Sarcina lutea.*

A substância é designada como *cassilisidina.* Quer pelo seu espectro antimicrobiano como pelo método de extração difere do ácido cássico (rheína), isolado por Robbins *et al.* (1947) [1] de *Cassia reticulata* e do alcalóide-antibiótico cas-

silisina isolado por Lima *et al.* (1957) (Ver artigo neste mesmo número).

Indicam-se o método de isolamento e purificação da substância, o espectro antimicrobiano *in vitro* e alguns caracteres químicos.

Quanto a toxidez a cassilisidina foi bem tolerada por camundongo à dose de 100 mg/Kg pêso vivo, aplicada subcutâneamente; 150 mg/Kg pêso vivo não foram tolerados quando administrados pela mesma via.

SUMMARY

Cassilysidine, a new antibiotic with lytic activity against *Bacillus subtilis* and *Sarcina lutea*, has been isolated from the bark of *Cassia excelsa* Schrad, a native plant of Brazil.

Cassilysidine is mainly active against species of gram-positive bacteria, Mycobacteria and Nocardiae. The antibiotic spectrum and the isolation procedure suggest that cassilysidine differs from cassilysine, isolated from *C. excelsa* (Lima *et al.*, 1957), and from rhein (cassic acid) isolated from another species of *Cassia*, *C. reticulata* Willd. (Robbins *et al.*, 1947).

When administered subcutaneously to albino mice, cassilysidine was lethal at a level of 150 mg/Kg while no harmful effect was observed at 100 mg/Kg.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ROBINS, W. J., KAVANAGH, F. e J. D. THAYER. 1947 — Antibiotic activity of **Cassia reticulata** Willd., Bull. Torrey Bot. Club, **74**, 287-292.

PRODUZIONE DI PIGMENTI FLAVINICI DA PARTE DI UN ATTINOMICETE

Orio Ciferri * *Marisa Pinheiro Machado*

Do Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife

INTRODUZIONE

Dopo che WARBURG e CHRISTIAN (1933) isolarono la riboflavina dalle cellule del *Clostridium butyricum*, la ricerca di questa vitamina nei microorganismi è stata quasi sempre positiva. Si può ansi affermare che quasi tutti i microorganismi, seppure con notevole variabilità quantitativa, sintetizzino riboflavina (vedansi, ad esempio, i risultati di PELTIER e BORCHERS, 1947, nel caso di 240 funghi isolati dal suolo).

Nella maggior parte dei casi la vitamina è prodotta in quantità molto piccole e sembra tenda a rimanere nelle cellule; la sua liberazione nei mezzi di cultura è pertanto molto scarsa avendosi solamente a seguito della lisi cellulare. Alcuni batteri e, soprattuto, alcuni funghi sono però capaci di metterne in libertà nei terreni di cultura, sia liquidi che solidi, notevoli quantità; è questo, ad esempio, il caso dei funghi lievitiformi *Eremothecium ashbyii* ed *Ashbya gossypii* studiati da GUILLIERMOND e coll. (1935) che, sotto particolari condizioni culturali, sono capaci di produrre sino a circa 2000 mcg di riboflavina per ml (WICKERHAM e coll., 1946).

Anche per l'interesse industriale che il problema ha assunto, molti lavori sono apparsi sull'argomento e la letteratura relativa è stata oggetto di accurate revisione (PE-

(*) — Indirizzo attuale: National Research Council, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Sask. Canada.

TERSON e PETERSON, 1945; VAN LANEN e TANNER, 1948; PRIDHAM, 1952; ecc.).

Degli *Actinomycetales* solo alcune specie del genere *Mycobacterium*, particolarmente *M. smegmatis* (MAYER e RODBART, 1946) e *M. tuberculosis* (SMITH e EMMART, 1949), producono riboflavina in quantità rilevanti. Sino ad ora nessuno degli Attinomiceti, peraltro ben noti per la produzione di vitamina B12 (RICKES e coll., 1948) e di tiamina (HERRICK e ALEXOPOULOS, 1943) si è rivelato capace di produrre riboflavina. HATA e coll. (1951), nello studiare il contenuto in vitamine dei liquidi di fermentazione dell'*Actinomyces griseus*, hanno trovato pressoché tutta la riboflavina (più del 90%) nelle cellule dell'*Actinomyces*. É evidente che la vitamina trovata esocellularmente è solamente quella liberatasi per la lisi del micelio e che, quindi, non si può parlare di una vera e propria produzione.

Nel corso di studi sulla produzione di antibiotici da parte di Attinomiceti, si notò che il liquido metabolico di una specie di *Actinomyces*, producente un antibiotico non ancora identificato, presentava già alla luce solare una intensa fluorescenza giallo-verde dovuta, presumibilmente, a dei pigmenti flavinici.

Il presente studio è una prima contribuzione alla conoscenza, sia qualitativa che quantitativa, di tali pigmenti.

MATERIALI E METODI

Cultura. — L'*Actinomyces* n.º 476 non è ancora stato identificato ma, probabilmente, appartiene al gruppo dell'*A. griseus*. Fu isolato da un campione di suolo proveniente dalla *fazenda* S. Maria, Municipio di Tabaiana (Paraiba).

Fermentazione ed estrazione dei pigmenti flavinici. — La fermentazione era condotta per 72 ore nel terreno Ml (*) su shaker rotatorio a temperatura ambiente (25-28º C). Dal liquido metabolico, liberato dalle cellule per centrifugazione, i pigmenti furono estratti con alcole *n*-butilico o mediante assorbimento su carbone attivato a pH 2 e successiva eluizione con piridina acquosa (20% in

(*) — Composizione del terreno Ml: glucosio 10 g; farina di soja 10 g; cloruro di sodio 5 g; carbonato di calcio 1 g; acqua 1000 ml.

acqua). Gli estratti butanolici e piridinici così ottenuti erano evaporati sotto vuoto ed il materiale attivo estratto con alcole etilico.

Determinazione dell'attività riboflavinica. — Il dosaggio microbiologico della vitamina, sia sul liquido originale che sul materiale proveniente dalle cromatografie, era eseguito utilizzando il *Lactobacillus casei* ATCC 7469 o il *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10100 secondo la técnica ben nota (ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS, 1951). In genere si preferì il primo batterio che, per la sua minore sensibilità, non era praticamente influenzato dalle tracce di impurezze contenute nei terreni campione.

Analisi cromatografica. — Si è usata la cromatografia su carta secondo la tecnica riportata da CRAMMER (1948) per la separazione della riboflavina e dei suoi derivati. Dei composti usati come campione, la riboflavina era prodotta dalla "California Foundation for Biochemical Research", il flavin-monucleotide (FMN) fu ottenuto da una preparazione farmaceutica per estrazione con alcole *n*-butilico e quindi con piridina, la lumiflavina per irradiamento della riboflavina in soluzione alcalina e sucessiva estrazione con cloroformio a pH neutro ed il lumicromo per irradiamento della riboflavina in soluzione acida, evaporazione sotto vuoto ed estrazione con alcole etilico assoluto. I dati relativi al flavin-dinucleotide (FAD), dal momento che non ci fu possibile ottenere il composto, sono stati desunti da quelli di WHITBY (1950, 1952). Dopo risoluzione, i cromatogrammi erano osservati direttamente alla luce di u. v. o rivelati con una soluzione di ninidrina (0,2% in alcole *n*-butilico acquoso).

Attività antibiotica. — Le macchie tagliate dai cromatogrammi erano poste alla superficie di scatole petri contenenti agar nutritivo seminato con una cultura di *Bacillus subtilis*. Le scatole così preparate erano incubate per 12 ore a 37º C e quindi osservate per l'eventuale apparizione di aloni di inibizione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del dosaggio microbiologico della riboflavina prodotta dall'*Actinomyces* 476 sono riportati nella Tabella I.

TABELLA I

DOSAGGIO DELLA RIBOFLAVINA PRESENTE NEL LIQUIDO METABOLICO

Liquido metabolico ml	NaOH 0,1 N necessaria per neutralizzare l'acido prodotto ml	Concentrazione della riboflavina nel liquido metabolico mcg/ml
0	0,9	—
0,1	2,0	— (*)
0,5	4,3	0,4 (**)
1,0	7,0	1,05
2,0	8,1	0,85
3,0	9,7	0,91
5,0	12,5	— (*)
		média 0,93

(*) — Il primo e l'ultimo valore non sono stati calcolati in quanto cadevano al di la degli estremi entro i quali la curva campione era significativa.

(**) — Questo dato non è stato preso in considerazione poichè la quantità di riboflavina era troppo piccola per essere significativa.

Eguale determinazione è stata eseguita utilizzando il *Leuconostoc mesenteroides* ottenendosi una concentrazione media di 1,2 mcg/ml di riboflavina. A nostro parere questo risultato è poco significativo in quanto i valore della titolazione del testimonio in bianco raggiungevano i 2 ml di NaOH, limite al di la del quale la tecnica di dosaggio non è più attendibile. Per questa ragione, come già fu detto, si è preferito usare il *L. casei* meno sensibile alle impurezze del terreno basale.

Nell'esperimento seguente fu determinata la riboflavi-

na prodotta da tre mutanti dell'*Actinomyces* 476, selezionati per la produzione dell'antibiotico (Tabella II).

TABELLA II

PRODUZIONE DI RIBOFLAVINA DA PARTE DI TRE MUTANTI DELL'*ACTINOMYCES* 476

Ceppo	Riboflavina mcg/ml
O (originale)	1,8
A	0,2
L	1,7
M	2,3

La differenza nei risultati ottenuti per il ceppo originale nel primo e nel secondo esperimento non ci sembra infici i risultati laddove si pensi che, pur cercando di mantenere le condizione costanti, è sempre possibile una variazione nella quantità dell'inoculo, nella composizione del terreno di cultura (anche in relazione alle variazioni della temperatura di sterilizzazione) ecc. Piuttosto ci parve che un contenuto di circa 2 mcg di riboflavina per ml fosse piuttosto modesto in relazione alla notevole fluerescenza mostrata dai liquidi metabolici. Ciò è propabilmente dovuto, come si vedrà più innanzi, al fatto che dei quattro composti fluorescenti caratterizzati nel liquido metabolico, uno solo possiede attività riboflavinica (ed è, forse, quello prodotto in minore quantità).

Per l'individuazione del composto, o dei composti, responsabili per l'attività riboflavinica si eseguirono cromatografie del liquido originale e delle preparazioni più concentrate ottenute per estrazione. Le cromatografie furono condotte in oscurità con il metodo monodimensionale discendente ed i risultati sono riportati nella Figura 1 e nella

Tabella III. In quest'ultima, oltre ai dati relativi al sistema *n*-butanolo: acido acetico: acqua (80:20:20,v/v) riportato da CRAMMER (1948) sono riferiti anche quelli relativi al sistema *n*-butanolo: acido formico: acqua (73:10:13,v/v) usato da WHITBY (1952).

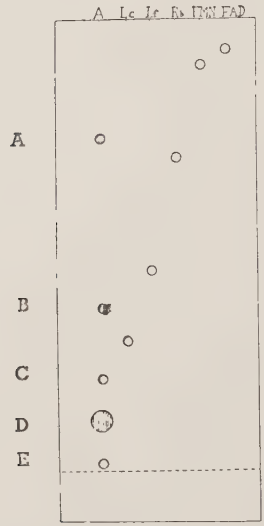


FIG. 1

Cromatografia dei composti caratterizzati nel liquido metabolico dell'ACTINOMYCES 476, della riboflavina e dei suoi derivati.

A — liquido metabolico dell'*Actinomyces* 476; Lc — lumicromo; Lf — lumiflavina; Rb — riboflavina; FMN — flavin-mononucleotide; FAD — flavin-dinucleotide.

Nel caso del liquido metabolico, il tratteggio orizzontale

indica fluorescenza azzurra, quello verticale fluorescenza gialla, nessun tratteggio assenza di fluorescenza.

La linea tratteggiata rappresenta il fronte del solvente (*n*-butanolo acido acetico: acqua).

Come appare evidente dai risultati nessuna delle quattro macchie fluorescenti (A con fluorescenza azzurra, B, C e D con fluorescenza gialla) corrisponde sia alla riboflavina che ai suoi nucleotidi od ai prodotti di decomposizione per irradiamento. La machia E, di colore giallo-bruno, non risultò fluorescente e fu la sola che mostrò possedere attività antibiotica. La rivelazione con ninidrina fu positiva per le macchie B e C cosicchè per le altre due fu possibile escludere la natura flavoproteica.

In un esperimento successivo, le macchie furono tagliate dai cromatogrammi e quindi suddivise in due parti di area approssimativamente eguale. Le macchie così tagliate furono direttamente collocate in tubi contenenti il terreno basale per il dosaggio microbiologico della riboflavina a mezzo *L. casei*. Come testimonio oltre al solo terreno basale, fu usato anche il terreno basale con um pezzo di carta proveniente dalla cromatografia. Il controllo era costituito dal terreno basale contenente un pezzo di carta di una cromatografia campione di riboflavina. I tubi, sterlizzati in autoclave, furono inoculati con il batterio teste e quindi incubati a 37º C per 72 ore. Dopo tale periodo, la crescita del *L. casei* fu determinata misurando l'acido lattico prodotto. I risultati (Tabella IV) mostrarono che la sola macchia A era capace di stimolare in maniera rilevante la crescita del batterio (e quindi la sola a possedere attività riboflavinica) mentre le altre quattro diederi risultati di poco superiori al testimonio e quindi scarsamente significativi. La differenza tra i due testimoni è, a nostro parere, dovuta a qualche impurezza contenuta nella carta da cromatografia (probabilmente tracce di acido acetico rimaste dopo essicazione del solvente rivelatore).

TABELLA III

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA DELLE FLAVINE CARATTERIZZATE NEL LIQUIDO METABOLICO DELL'*ACTINOMYCES* 476, DELLA RIBOFLAVINA E DEI SUOI DERIVATI

Composto	Rf	
	n-butanolo/ac. acetico/acqua	n-butanolo/ac. formico/acqua
FAD	0,03 (*)	0 (*)
FMN	0,11	0 (*)
Riboflavina . . .	0,31	0,26
Lumiflavina . . .	0,56	0,48
Lumicromo . . .	0,73	0,74 (**)
Macchia A . . .	0,27	0,24
Macchia B . . .	0,64	0,62
Macchia C . . .	0,78	0,83
Macchia D . . .	0,88	0,93
Macchia E . . .	0,96	0,98

(*) — Valori desunti da WHITBY (1950, 1952).

(**) — Valore scarsamente attendibile poichè in questo solvente il lumicromo si presenta con una macchia molto allungata.

TABELLA IV

STIMOLAZIONE DELLA CRESCITA DEL *LACTOBACILLUS CASEI*

	ml di NaOH necessari per neutralizzare l'acido lattico prodotto (*)
Mezzo basale (testimonio I)	1,30
" " + campione di carta (testimonio II) . . .	1,50
" " + macchia A	2,05
" " + macchia B	1,60
" " + macchia C	1,60
" " + macchia D	1,65
" " + macchia E	1,55
" " + macchia campione di riboflavina (controllo)	3,20

(*) — Ciascun dato è la media di due valori, in tutti i casi i due valori non discordando tra di loro di ± 0,1 ml. I dati relativi al primo testimonio sono desunti da cinque determinazioni, essendosene scelte quattro concordanti tra di loro per almeno ± 0,05 ml.

Le caratteristiche dei composti isolati per cromatografia sia direttamente dai liquidi metabolici che dagli estratti più concentrati, sono riassunte nella Tabella V.

TABELLA V

CARATTERISTICHE DEI COMPOSTI SEPARATI PER CROMATOGRAFIA

Macchia	Rf in n-butanolo/ac. acetico/acqua	Colore	fluorescenza	Reazione con ninidrina	Attività riboflavinica	Attività antibiotica
A	0,27	—	azzurra	—	+	—
B	0,64	giallo	gialla	+	±	—
C	0,78	giallo	gialla	+	±	—
D	0,88	giallo	gialla	—	±	—
E	0,96	giallo-bruno		—	—	+

La sostanza attiva, che per semplicità indicheremo come flavina. A, non è identificabile con la riboflavina sia per il comportamento alla cromatografia (la pur piccola differenza tra gli Rf sempre si mantenne nei vari solventi anche quando si sovrimposero all'origine riboflavina e flavina-A) sia per il diverso comportamento alla luce naturale ed a quella u.v. D'altra parte, come già fu osservato, non è possible identificarla anche con i flavinnucleotidi od i prodotti della decomposizione per irradiamento della riboflavina. Il colore della fluorescenza sembra inoltre escludere l'identità con il riboflavinil-glucoside isolato da WHITBY (1952) nè abbiamo elementi sufficienti per poter paragonare la flavina-A con la flavina che WADSWORTH e CROWE (1943) isolarono dai liquidi di coltura del *Corynebacterium diphteriæ* o con il flavin-nucleotide-X di SANADI e HUENNEKENS (1952) (*). Esiste, invece, qualche somiglianza con uno dei

(*) — La produzione di nuovi pigmenti flavinici con fluorescenza di colore differente da quello giallo non pare sia cosa molto rara; recentemente, in uno studio dettagliato sulla biosintesi della riboflavina da parte di varie specie de **Candida**, KNÜSEL (1957) ha riferito la presenza di pigmenti a fluorescenza azzurra e violetta nei liquidi metabolici, rispettivamente, di **C. Guilliermondii** var. **nitratophila** e di **C. lipolytica**.

derivati che HAIS e PECAKOVA (1949) produssero per azione del perossido d'idrogeno sulla riboflavina in soluzione alcalina. Come il secondo di questi prodotti, infatti, la flavina-A si presenta incolore alla luce naturale e con fluorescenza azzurra a quella u.v. mentre gli Rf, pur non essendo identici, sono abbastanza vicini. Supponendo una tale identità deve escludersi che la flavina-A sia un artefatto dei processi estrattivi in quanto già è presente nei liquidi metabolici. Resta da vedere, invece, se sia prodotta dall'*Actinomyces* direttamente sotto questa forma o non si tratti di un prodotto di transformazione, durante la fermentazione della riboflavina o di altra flavina.

CONCLUSIONI

1) L'*Actinomyces* 476 produce in terreni liquidi pigmenti flavinici con attività corrispondente ad un tenore di riboflavina di 0,9-2,3 mcg/ml. Per quanto ci consta, è la prima volta che un tale fenonemo è riportato per un Attinomicete.

2) Dei quattro pigmenti flavinici presenti nei liquidi metabolici, uno solo, provvisoriamente denominato flavina-A, è capace di sostenere la crescita di un ceppo riboflavino-deficiente di *Lactobacillus casei*. Per il momento non è possibile identificare la flavina-A con alcuno dei composti noti, sebbene per certe sue caratteristiche essa assomigli ad un derivato della riboflavina ottenuto per azione del perossido d'idrogeno in soluzione alcalina (HAIS e PECAKOVA, 1949).

RIASSUNTO

Un Attinomicete non ancora identificato, e provvisoriamente denominato *Actinomyces* 476, è capace di produrre in terreni liquidi pigmenti flavinici in quantità corrispondenti ad un tenore in riboflavina di 0,9-2,3 mcg/ml. Tali pigmenti possono essere estratti dal liquido metabolico con *n*-butanolo o mediante adsorbimento su carbone attivato ed eluizione con piridina acquosa.

A mezzo cromatografia su carta si è constatata la presenza di almeno quattro composti fluorescenti (tre con fluorescenza gialla ed uno con fluorescenza azzurra). Dei

quattro pigmenti solamente quello con fluorescenza azzurra è capace di stimolare la crescita di un ceppo riboflavino-deficiente di *Lactobacillus casei*. Per il comportamento alla cromatografia e per il colore della fluorescenza non è possibile identificare tale composto sia con la riboflavina che con e suoi nucleotidi (FMN e FAD) o con i prodotti di decomposizione per irradiamento della riboflavina (lumiflavina e lumicromo).

SUMMARY

A still unidentified species of *Actinomyces* has been found capable of producing in liquid media flavin pigments in a concentration corresponding to a riboflavin content of 0.9-2.3 mcg/ml.

Chromatographic analysis of the original brues as well as of more concentrated preparations revealed at least four fluorescent spots (three with yellow fluorescence and one with blue fluorescence). Only the spot with blue fluorescence was capable of stimulating the growth of a riboflavin-requiring strain of *Lactobacillus casei*. The active compound cannot be identified either with riboflavin or its nucleotides (FMN, FAD) or its decomposition products (lumiflavine and lumichrome).

BIBLIOGRAFIA

ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS. (1951). Methods of Vitamin Assay, II Ed., p. 149, Interscience Publ., New York.

CRAMMER, J. L. (1948). Nature, Lond., **161**, 349.

GUILLIERMOND, A., FONTAINE, M. e A. RAFFY. (1935). Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), **201**, 1077 (**fide** PRIDHAM, T. G., **10**).

HAIS, I. M. e L. PECAKOVA. (1949). Nature, Lond., **163**, 768.

HATA, T., YOKOKAWA, Y., HIGUCHI, T., SANO, Y. e K. SAWCHIKA. (1951). J. Antibiotics, **4**, ser. A, 31.

HERRICK, J. A. e C. J. ALEXOPOULOS. (1943). Bull. Torrey Bot. Club, **70**, 369.

KNÜSEL, F. (1957). Arch. Mikrobiol., **27**, 219.

MAYER, R. L. e M. RODBART. (1946). Arch. Biochem., **11**, 49.

PELTIERS, G. L. e R. BORCHERS. (1947). J. Bacteriol., **54**, 519.

PETERSON, W. H. e M. S. PETERSON. (1945). Bact. Rev., **9**, 49.

PRIDHAM, T. G. (1952). Econ. Bot., **6**, 185.

RICKES, E. L., BRINK, N. G., KONIUSZY, F. R., WOOD, T. R. e K. FOLKERS. (1948). Science, **108**, 634.

SANADI, D. R. e F. M. HUENNEKENS. (1950). 117th Meeting Amer. chem. soc., Abstr., 60 C (**fide** WHITBY, L. G., **18**).

SMITH, M. I. e E. W. EMMART. (1949). J. Immunol., **61**, 259 (**fide** PRIDHAM, T. G., **10**).

VAN LANEN, J. M. e F. W. TANNER. (1948). Vitamins and Hormones, **6**, 163.

WADSWORTH, A. B. e M. O' L. CROWE. (1943). J. Infectious Dis., **73**, 106 (**fide** WOIWOD A. J. e F. V. LINCGOOD. (1948). Nature, Lond., **162**, 219).

WARBURG, O. e W. CHRISTIAN. (1933). Biochem. Z., **236**, 377 (**fide** PRIDHAM, T. G., **10**).

WHITBY, L. G. (1950). Nature, Lond., **166**, 479.

WHITBY, L. G. (1952). Biochem. J., **50**, 433.

WICKERHAM, L. J., FLICKINGER, M. H. e R. M. JOHNSTON. (1946). Arch. Biochem. **9**, 95.

NÒTA:

Questo lavoro era gia in composizione quando e' apparso una nota di Forrest e McNutt (J. Am. Chem. Soc., *80*, 739, 1958) riguardante l'isolamento da culture di *Eremothecium ashbyii* di un composto, "'Composto A", a struttura riferibile in parte alle isoallosazine seppure non direttamente connesso con la biosintesi della riboflavina. Il colore della fluorescenza, il comportamento alla cromatografia ed il metodo d'isolamento farebbero sospettare, se non una identita', almeno una stretta somiglianza tra il "Composto A" e la "Flavina A" da noi isolata. I summenzionati autori hanno parzialmente caratterizzato il "Composto A" come un derivato della 2,4-diossipteridina riportando che un composto a struttura analoga era stato precedentemente isolato da Masuda (Pharm. Bull., 4, 375, 1956) dal micelio di *E. ashbyii*. Il "Composto G" di Mesuda, il "Composto A" di Forrest e McNutt e, forse, la nostra "Flavina A" sarebbero i primi composti con questa struttura isolati in natura.

STREPTOMYCES DE AMPLIO ESPECTRO ANTIMICROBIANO, AISLADOS DE SUELOS DE BRASIL

A. Sanchez-Marroquin *

Instituto de Antibióticos da Universidade do Recife

En la incesante búsqueda de nuevos antibióticos, los investigadores de diversas partes del mundo han aislado y probado miles de cepas microbianas. Entre éstas, los *Actinomycetes* ocupan un importantísimo lugar desde que Waksman, en 1940, aisló por primera vez un antibiótico de este grupo de microorganismos, la actinomicina, que actualmente ha sido objeto de nuevos estudios.

En el Brasil, el Instituto creado en 1952 con este fin por la Universidad de Recife, se ocupa de tan interesantes investigaciones.

La presente comunicación se refiere a un estudio general de un grupo de *Streptomyces* seleccionados entre gran cantidad de cepas aisladas en ese Instituto, como productoras de principios antibióticos de amplio espectro antimicrobiano.

Algunas de esas cepas serán objeto de estudios posteriores más detallados. Por ahora se presentan unicamente sus características principales, su determinación taxonómica y su actividad antimicrobiana general, con indicación de los antibióticos producidos por algunas de esas cepas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Cepas. Un gran número de *Streptomyces* aislados de

* Dirección actual: Escuela Nacional de Ciencias Químicas.
Ciudad Universitaria. México 20, D. F. México.

suelos de diversas partes del Estado de Pernambuco mediante el método de las diluciones en placa, se probaron por el método de Garré, respecto a su actividad antagonista para diversos grupos de microorganismos: Gram-positivos, Gram-negativos, ácido-resistentes, hongos levaduriformes y hongos filamentosos.

Las cepas de *Streptomyces* que presentaron más amplio espectro antimicrobiano se seleccionaron para el estudio de su actividad en los diferentes medios líquidos cuya composición química se muestra en la tabla I, para lo cual se sembraron en 50 ml de tales medios en matraces de 250 ml, en agitación, tomando muestras a las 48, 72 y 96 horas para las pruebas de discos.

Micromorfología. Se seguió el procedimiento de Dreschler de impresión en lámina y el de las placas Dalmau-Benham, método utilizado para estudios de levaduras (13) y aplicado en este trabajo al de los *Streptomyces*. Se empleó unicamente nuestro medio "3" de esporulación, ya que dió los mejores resultados en pruebas previas.

Macromorfologia. Las observaciones se practicaron después de cultivar las cepas durante 4-15 días en los siguientes medios: Czapek, malato de calcio, gelatina, Pridham-Gottlieb, Ayers modificado, glucosa-asparagina, glucosa-peptona, almidón, papa y leche bromo-cresol.

Pruebas bioquímicas. La reducción de nitratos, hidrólisis de almidón y actividad proteolítica se averiguó conforme a los métodos ordinarios. La asimilación de compuestos de C se estudió siguiendo el método de Pridham y Gottlieb (9), haciendo las lecturas a los 10 días. La fermentación de manosa, hidrólisis de caseina y descomposición de tirosina se investigaron de acuerdo con las técnicas sugeridas por Gordon (7).

Determinación taxonómica. Se efectuó siguiendo las claves de Waksman y Lechevalier (12).

RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla I indica la composición de los medios de cultivo empleados para la esporulación y la produción de los antibióticos. Los medios "E-3" y "E-4" resultaron los más adecuados para el primer propósito y los medios "M-10", "S-1", "M-2", "G", "W" y caldo simple para el segundo.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos del estudio de la actividad antibacteriana y en la tabla III, los

TABELA I —

Materiales	E—O (Anderson)	E—1 (Marroquín)	E—3 (Marroquín)	E—4 (Carvaja
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	—
K_2HPO_4	3.0	1.2	0.60	—
$(NH_4)_2HPO_4$	—	—	—	—
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0015	—	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	0.0011	0.002	0.002	—
KH_2PO_4	—	—	—	—
NaCl	0.50	—	—	—
KCl	—	—	—	—
$MnCl_2.7H_2O$	0.0079	0.0030	—	—
$MgSO_4$ 7H O 4 2	—	—	—	—
$CuSO_4$ 5H O 4 2	0.0064	0.0025	—	—
Co $(NO_3)_2$ 6H O 2	—	—	—	—
Glucosa	—	—	—	—
Almidón	—	2.0	—	—
Maltosa	10.0	—	2.0	—
Sacarosa	—	—	—	—
Glicina	—	—	—	—
Peptona	—	2.0	—	—
Triptona	5.0	—	—	—
Exto. carne	—	—	—	—
Exto. levaduras	—	—	—	—
Água coc. maiz	—	—	—	—
Harina de soja	—	—	—	—
Harina de trigo	—	—	4.0	—
Avena	—	—	—	13.0
Água distilada	1000	400	200	200
Agua de la llave	—	—	—	—

* Los 7 primeiros médios, com 1.5 a 2.0% de agar. Todos los médios a pH 6.

Médios empleados en la esporulación y produción de antibióticos por las ce

l)	E—5 (Grundy)	Pridham-Gottlieb	Ayers modif.	S—1 (Marroquín)	AC—1 (Marroquín
	—	2.64	—	—	—
	—	5.65	—	3.0	3.0
	0.20	—	1.0	—	—
	—	0.0015	—	—	—
	—	0.0011	—	0.01	0.01
	—	2.38	—	—	—
	—	—	—	—	—
	0.04	—	0.20	—	—
	—	0.0079	—	—	—
	0.04	1.0	0.20	0.50	0.50
	—	0.0064	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	10	10
	1.0	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	3.0
	—	—	—	20	—
	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—
	200	1000	1000	1000	1000
	—	—	—	—	—

TABLA II — ESPECTRO ANTIBACTERIANO DE LAS CEPAS DE STREPTOMYCES SELECCIONADAS

(Método de la estría y método de los discos)

Streptomyces	M. pyogenes var. aureus	B. subtilis	S. lutea	E. coli	S. typhosa	B. melitensis	P. vulgaris	K. pneumoniae	M. phlei	M. smegmatis	Noc. asteroides
B-25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SB-9	+	+	+	±	±	±	±	+	+	+	±
SB-6	+	+	+	±	±	±	±	±	+	+	±
PSI-10	+	+	+	±	±	±	—	+	+	+	±
K-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mb-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mb-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DI-15	+	+	+	+	+	+	±	±	—	—	—
DI-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A-3	+	+	+	+	+	±	±	+	±	+	—
SB-7	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	—
DI-7	+	+	+	±	±	±	—	—	+	+	+
N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7K'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DI-10	+	+	+	±	—	—	—	+	+	+	+
A-24	+	+	+	—	—	—	—	+	—	+	—
A-32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SB-10	+	+	+	—	—	—	—	±	±	+	±
SB-12	+	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—

TABLA III — ESPECTRO ANTIFÚNGICO DE LOS STREPMYCES ESTUDIADOS

Streptomyces	C. albicans	Cr. neoformans	Coccidioidis immitis	F. cubensis	F. lycopersici	Diplodia zeæ
B-25	+	+	+	±	+	±
SB-9	±	—	—	±	±	—
SB-6	—	±	—	—	±	±
PSI-10	±	±	—	±	—	±
K-7	+	+	±	±	±	±
mb-2	+	+	+	+	+	+
mb-1	±	±	±	+	±	±
DI-15	+	+	±	—	±	±
DI-11	±	+	±	±	+	+
A-3	—	—	—	—	±	+
SB-7	—	—	—	—	±	—
DI-7	+	±	±	+	+	±
N	+	+	+	+	+	+
7K'	+	+	±	±	±	±
A-20	+	±	+	+	+	+
DI-10	+	—	—	±	±	+
A-24	+	—	—	—	—	—
A-32	±	—	—	—	—	—
SB-10	—	—	+	±	±	—
SB-12	—	—	—	—	—	—

TABLA IV — ASIMILACIÓN DE AZÚCARES Y POLIALCOHOLES

Streptomyces	Ramnosa	Rafinosa	Manosa	Dulcitol	d-Xilosa	Manitol	Inositol	Lactosa	Sacarosa	Arabinosa
B-25	+	—	+	—	—	±	±	+	+	—
SB-9	—±	±—	+	—	+	+	—	±—	—	—
SB-6	±—	—	+	±	±+	+	±—	—	—	—
PSI-10	—±	±—	+	—	+	+	—	±	—	±
K-7	—	—	+	—	—	+	—	±—	—	—
mb-2	—	±	+	±	+	±	+	+	±	+
mb-1	±	±	+	—	±	±	+	+	+	±
DI-15	±	—	+	—	+	+	±	+	+	+
DI-11	±	±	+	—	+	+	+	+	+	+
A-3	—	±	±	—	+	+	+	+	—	—
SB-7	—	—	+	—	±+	±+	—	±	—	±—
DI-7	—	—	+	—	+	—	—	+	—	+
N	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
7K'	—±	—	+	—	±	—	—	—	—	±
A-20	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
DI-10	—±	—	+	—	+	+	—	—	—	—
A-24	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—±
A-32	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—
SB-10	—	+	+	±	+	+	+	±	+	±
SB-12	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—

de la acción antifúngica. Como puede apreciarse, los *Streptomyces* seleccionados exhibieron un amplio espectro antimicrobiano y la intensidad del efecto antagonista fué igualmente ostensible.

Las propiedades bioquímicas principales de las cepas estudiadas se consignan en las tablas IV y V.

Con los datos morfológicos y fisiológicos obtenidos, se llegó a la clasificación de las cepas como se indica en la tabla VI en donde aparecen, además, los resultados de la investigación de los antibióticos producidos por algunas de las cepas.

Al revisar las características de cultivo y las pruebas bioquímicas, se apreciaron grandes dificultades para compararlas con las descritas en la bibliografía respecto a especies tipo, especialmente en lo que concierne al color del micelio aéreo y producción de pigmento.

Las cepas B-25 y DI-11 fueron de las que se ajustaron más fielmente a las descripciones tipo (12) para las especies *S. roseochromogenus* y *S. albus*, respectivamente. Esta última sólo difiere en que no licúa la gelatina o la licúa muy lentamente.

Las cepas mb-1 y mb-2 correspondieron a una misma especie identificada como *S. roseoflavus* (12) y al estudiar los antibióticos producidos por ambas, se encontró que correspondían en sus características a las de la neomicina (12) dato que contribuye a la aceptación de la identidad taxonómica. Para la obtención de estos principios se siguió un método semejante al empleado para el aislamiento del antibiótico de la cepa 'N", como se describe más adelante.

La cepa A-3 difiere de *S. ruber* en que produce pigmento café-rojizo en medios glucosados, en vez de rojo coral; sin embargo produjo este pigmento en los medios "3" y "4".

Los cultivos A-24, SB-10 y SB-12 pertenecen definitivamente a la especie *S. erythreus*. Los filtrados de los cultivos en agitación se trataron con benceno y se procedió a aplicar la técnica de McGuire (8) para la extracción del antibiótico obteniéndose una substancia con las características de la eritromicina (8, 12).

Las cepas "N" y A-20 (grupo *S. lavendulæ*), produjeron un antibiótico tipo estreptotricina que se extrajo mediante adsorción en norita A, seguida de elución con etanol al 70% y purificación final con ácido pícrico, obteniéndose luego el material en forma de sulfato que se identificó más tarde por cromatografía en papel, según el método de Ammann

TABLA V — OTROS DATOS BIOQUÍMICOS

Streptomyces	Hidrólisis de la Gelatina	Reducción de NO3	Hidrólisis del Almidón	Acción sobre la leche	Fermentación de Manosa	Hidrólisis de la Caseina (mm)	Descomposición de la Tirosina
B-25	±	+	+	C y P lentas	++	19	+
SB-9	+	+	+	Idem	+++	20 a 26	+++
SB-6	+	—	+	C y P	+	25	+
PSI-10	—	+	+	C, P y A	++	19 a 23	+++
K-7	±	±	±+	Idem	++	10 a 19	++
mb-2	++	+	+	C fuerte, P y A	+++	26	++
mb-1	++	+	+	C, P y A	++	28	++
DI-15	—±	+	+	No C, A ligeramente	++	19	+++
DI-11	—±	+	+	C y P	+	22	++
A-3	—	—	+	C y P muy lentamente	+	24	+
SB-7	+	—	—	C y P	++	23	++
DI-7	++	+	+	C y P	+++	22	+++
N	±	—±	+	C lenta, A y P	+	18	+
7K'	+	±	—±	C y P	++	19	+++
A-24	+	—	+	Idem	++	21	++
DI-10	+	±	+	Idem	+++	18	++
A-20	+	—	+	Idem	+++	25	++
A-32	+	+	+	Idem	+++	20	
SB-10	+	—	+	Idem	++	19	-
SB-12	+	—	+	Idem	++	21	-

C: coagulación; P: peptonización; A: alcalinazación.

y Gottlieb (1) empleando a *B. subtitlis* para el revelado biológico. Además se establecieron sus principales propiedades físicoquímicas, según Baron (2).

En cambio, las cepas K-7 y 7K-1, clasificadas como éstas en el grupo *S. lavendulæ*, producen un antibiótico diferente a la estreptotricina, de fuerte actividad antiestafilocócica, que Gonçalves de Lima *et al.* (5) obtuvieron de los filtrados de cultivos en caldo-sacarosa y designaron con el nombre de *eurimicina*. La primera de estas cepas, K-7, fué estudiada desde el punto de vista de sus características morfológicas y fisiológicas por Zapata *et al.* (14) concordando sus descripciones con las nuestras.

La cepa DI-15 correspondió a *S. globosus*. Sólo difiere en que el micelio aéreo cambia del color gris típico a canela-rojizo, en la mayoría de los medios.

El cultivo DI-7 pertenece indudablemente a la especie *S. griseolus*. En medios con harina de soja o con glucosa-extracto de levaduras, produjo actinomicina que se identificó por cromatografia de los filtrados crudos, según el método papirográfico de Snell *et al.* (11), extrayendola posteriormente por la técnica que desarrollamos en outro trabajo (6).

Las cepas SB-6 y SB-7 se asemejaron más a *S. vinaceus* que al resto de especies del mismo grupo, según la clave de Waksman y Lechevalier (12).

Por último, las cepas PSI-10, SB-9 y DI-10 que se consideraron al principio como idénticas a *S. californicus*, y las cepas SB-6 y SB-7, ya señaladas, se estudiaron luego en forma más amplia, comparándolas con *S. griseus*, *S. vinaceus*, *S. floridæ* y *S. californicus*, a causa de que Burkholder *et al.* (4) han considerado recientemente a estas especies como idénticas a *S. griseus*. Los datos se consignarán en otro trabajo. Estas cepas produjeron viomicina en los medios M-10 y caldo simple, identificándose por el método de Snell *et al.* (11) realizando la bioautografía con *B. megatherium* B-938. Posteriormente se obtuvo la substancia por el procedimiento de Bartz *et al.* (3) y se confirmó su naturaleza como se indicará en otra publicación.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudian 20 cepas de *Streptomyces* de amplio espectro antimicrobiano.

Del análisis del comportamiento bioquímico de las

TABLA VI — CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS Y ANTIBIÓTICOS PRODUCIDOS

Cepas	Medios líquidos de elección	Clasificación	Antibióticos obtenidos
B-25	S-1 y M-10	S. roseochromogenus	—
SB-9	S-1, M-10 y C.S.	S. californicus	Viomicina
SB-6	M-10 y AC-1	S. vinaceus	Viomicina
PSI-10	M-10, C.S. y S-1	S. californicus	Viomicina
K-7	C.S.	Grupo S. lavendulæ	Eurimicina
mb-2	M-10, C.S. y S-1	S. roseoflavus	Neomicina
mb-1	Idem	S. roseoflavus	Neomicina
DI-15	S-1	S. globosus	—
DI-11	S-1 y M-10	S. albus	—
A-3	M-10 y W	S. ruber	—
SB-7	C.S. y M-6	S. vinaceus	Viomicina
DI-7	S-1 y M-10	S. griseolus	Actinomicina
N	C.S.	S. lavendulæ	Estreptotricina
7K'	C.S.	Grupo S. lavendulæ	Eurimicina
A-20	C.S. y M-10	S. lavendulæ	Estreptotricina
DI-10	C.S. y S-1	S. californicus	Viomicina y otro.
A-24	S-1, M-10 y 6-1	S. erythreus	Eritromicina
A-32	10 y AC1	S. griseus	Estreptomicina
SB-10	C.S., M-10 y G-1	S. erythreus	Eritromicina
SB-12	S-1, M-10 y G-1	S. erythreus	Eritromicina

cepas, así como de las caracteristicas de su micro y macromorfología, se llegó a la determinación taxonómica de las siguientes especies: *S. roseochromogenus*, *S. californicus* (3 cepas), *S. vinaceus* (2 cepas), *S. albus*, *S. griseus*, *S. roseoflavus* (2 cepas), *S. globosus*, *S. griseoluteus*, *S. griseolus*, *S. lavendulæ* (4 cepas) y *S. erythreus* (3 cepas).

Las sustancias cristalinas obtenidas correspondieron en sus características fisicoquímicas a los siguientes antibióti-

cos: viomicina, neomicina, actinomicina, estreptotricina, estreptomicina y eritromicina.

Por otra parte, se comprobó la semejanza estrecha que existe entre las especies productoras de viomicina y *S. griseus*.

Las 20 cepas estudiadas hidrolizaron la caseina, descompusieron la tirosina y fermentaron la manosa, datos que según Gordon (7) corresponden a *Streptomyces* con exclusión de *Nocardia*. Asimismo todas las cepas asimilaron glucosa y almidón y no utilizaron el dulcitol.

SUMMARY

In the course of a screening program for antibiotic activities of *Streptomyces* conducted at the Institute of Antibiotics at Recife, Brazil, several strains were found to possess a strong antagonistic spectrum for gram-positive, gram-negative and acid-fast bacteria as well as for some filamentous and yeastlike fungi. Among these antagonistic cultures, 20 strains were selected for further study and taxonomically determined as: *S. roseochromogenus*, *S. californicus*, *S. vinaceus*, *S. lavendulæ*, *S. erythreus*, *S. roseoflavus*, *S. griseus*, *S. globosus*, *S. griseolus*, *S. griseoluteus* and *S. albus*. Some of the Streptomyces strains were shown to disconform slightly with corresponding species descriptions in Waksman and Lechevalier keys.

Some of the antibiotics produced by the strains under study were chromatographycally identified, then isolated as purified substances and characterized as viomycin, streptothricin, streptomycin, actinomycin and neomycin.

Nos es grato expresar nuestro sincero agradecimiento a los Sres. Joaquim Inacio de Almeida Amazonas y Oswaldo Gonçalves de Lima, Magnifico Rector de la Universidad de Recife y Director del Instituto de Antibióticos, respectivamente, por las facilidades prestadas para el desarrollo del presente trabajo.

Asimismo agradecemos a los Dres. Juan A. Mackinnon, Chaves-Batista, D. Gottlieb, N. Snell, J. Erlich y C. W. Hesseltine habernos proporcionado algunos de los microorganismos de prueba.

REFERÊNCIAS

1. AMMANN, A. and D. GOTTLIEB. **Appl. Microbiol.**, **3**: 181-186, 1955.
2. BARON, A. L. **Handbook of Antibiotics.** Reinhold Pub. Co. N. York 1950.
3. BARTZ, Q. R., J. EHRLICH, J. D. MOLD, M. A. PENNER and R. M. SMITH. **Am. Rev. Tuberc.**, **63**: 4, 1951.
4. BURKHOLDER, P. R., S. H. SUN. L. E. ANDERSON and J. EHRLICH. **Bull. Torrey Bot. Club.**, **82**: 108-117, 1955.
5. GONÇALVES DE LIMA, O., J. O. FALCÃO DE MORAIS, M. H. MAIA e M. G. MACIEL. **An. Soc., Biol. Pernambuco, 14**: 68-76, 1956.
6. GONÇALVES DE LIMA, O. y A. SÁNCHEZ-MARROQUÍN. **Microb. Española, 6**: 127-128, 1953.
7. GORDON, R. E., and M. M. SMITH. **Jour. Bact., 69**: 147-150, 1955.
8. McGUIRE, J. M. **Antibiotics and Chemotherapy, 2**: 281, 1952.
9. PRIDHAM, T. G. and D. GOTTLIEB. **Jour. Bact., 56**: 107-114, 1948.
10. SÁNCHEZ-MARROQUÍN, A. **Ciencia (Méx.)**. Vol. XVI, Nos. 11-12, 1957. (En prensa).
11. SNELL, N., K. IJICHI and J. C. LEWIS. **Appl. Microbiol., 4**: 13-17, 1956.
12. WAKSMAN, S. A. and H. LECHEVALIER. Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1953.
13. WICKERHAM, L. J. **Taxonomy of Yeasts. U. S. Dept. Agr. Tech. Bull.** No. **1029**: 1-56, 56, 1951.
14. ZAPATA, M., O. GONÇALVES DE LIMA, J. O. FALCÃO DE MORAIS, L. A. ARAUJO e C. LARIOS. **An. Soc. Biol. Pernambuco**, 11: 11-14, 1953.

O Instituto de Antibióticos — órgão anexo à Escola Superior de Química da Universidade do Recife — foi fundado pelo Conselho Universitário, em sessão de 8 de março de 1952, por proposta do então Diretor daquela Escola.

Êste periódico é dirigido pelo **Instituto de Antibióticos** e publicado pela Imprensa da Universidade do Recife (Brasil), destinando-se especialmente à divulgação dos resultados das atividades científicas do mencionado instituto.

Anteriormente à sua criação, a maioria de tais resultados vinha sendo publicada nos **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco.**

Merecerá sempre a melhor acolhida tôda colaboração de interêsse científico e enquadrada em a natureza desta revista, oferecida por investigadores — nacionais ou estrangeiros — que desejem utilizá-la como veículo de divulgação de seus trabalhos no campo dos antibióticos.

Qualquer correspondência poderá ser expedida para o seguinte endereço:

Revista do Instituto de Antibióticos
Rua Dom Bôsco, 1002
Recife — BRASIL

Comissão de Redação: Oswaldo Gonçalves de Lima
Luiz de Albuquerque Araújo
José Otamar Falcão de Morais

Diretor do Instituto de Antibióticos:

Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima

Reitor da Universidade do Recife:

Prof. Joaquim Inácio de Almeida Amazonas

Trabalhos anteriormente publicados pelo Instituto de Antibióticos:

N.º 1. (Revista de Química Industrial, N.º 249, Rio de Janeiro, 1953). Biflorina, novo antibiótico isolado da **Capraria biflora** (**Scrophulariaceae**). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Paulo Loureiro, Carlos Larios Carmona & Mario Zapata Bènard.

N.º 2. (ANAIS da Sociedade de Biologia de Pernambuco, Tomo XI, N.º 1, Universidade do Recife, 1953). Novas observações sôbre a Biflorina — antibiótico isolado da **Capraria biflora** L. (Scrophulariaceae). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque e Paulo Loureiro.

N.º 3. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XI, N.º 1, Univ. Recife, 1953). Estudo de um **Streptomyces sp.** (Cêpa K-7, do Instituto de Antibióticos) ativo contra **Mycobacterium spp.** e **Escherichia coli** R. Por Mario Zapata Bènard, Oswaldo Gonçalves de Lima, José Otamar Falcão de Morais, Luiz de Albuquerque Araújo e Carlos Larios Carmona.

N.º 4. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XI, N.º 1, Univ. Recife, 1953). Isolamento e estudos preliminares de uma substância antibiótica

produzida por um **Streptomyces sp.** (Cêpa K-7 do Inst. Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, José Otamar Falcão de Morais, Mario Zapata Bènard e Luiz de Albuquerque Araújo.

N.º 5. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Estudo sumário de um **Streptomyces** (cêpa 7K1 do Inst. de Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Luiz de Albuquerque Araújo, José Otamar Falcão de Morais, Marisa Pinheiro Machado e Carlos Larios Carmona.

N.º 6. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Estudo sôbre a Eurimicina, antibiótico produzido pelo **Streptomyces sp.** (cêpa 7K1 do Inst. Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Luiz de Albuquerque Araújo, José Otamar Falcão de Morais, Marisa Pinheiro Machado, Antônio Andrade e João Wanderley de Siqueira Neto.

N.º 7. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954). Alamandina, novo antibiótico ativo contra protozoários, isolado de **Allamanda violacea** (**Apocynaceae**). Por Oswaldo Gonçalves de Lima e José Moreira Caldas.

N.º 8. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954.) Selovicina, novo antibiótico isolado de **Croton sellowii** Baill. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Paulo Loureiro, Luiz de Albuquerque Araújo e Antônio Andrade.

N.º 9. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XII, N.º 1, Univ. Recife, 1954.) Observações preliminares sôbre um antibiótico produzido por um **Streptomyces** (cêpa A-24 do Inst. Antib. Univ. Recife). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Paulo Loureiro e José Otamar Falcão de Morais.

N.º 10. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, Nº 1, Univ. Recife, 1955). Primeiras observações sôbre a ação antibacteriana de extratos de amêndoas de **Virola gardneri**. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, I. L. d'Albuquerque, A. Andrade, M. Pinheiro Machado, J. O. Falcão de Morais, G. Pereira Pinto e P. Loureiro.

N.º 11. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 1, Univ. Recife, 1955). Nova espécie do gênero **Acetobacter**: **A. lermae**. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, J. O. Falcão de Morais e C. L. Carmona.

N.º 12. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 1, Univ. Recife, 1955). Nova espécie do gênero **Nocardia**: **N. recifei**, sua atividade antagonista. Antibiótico Produzido. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, M. Pinheiro Machado, L. de Albuquerque Araújo, J. O. Falcão de Morais e H. Biermann.

N.º 13. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 2, Univ. Recife, 1955). Primeiras observações sôbre um antibiótico do grupo da estreptotricina. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Pinheiro Machado, José Otamar Falcão de Morais, Hans Biermann, Evans Silva e Antônio Andrade.

N.º 14. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 2, Univ. Recife, 1955). Breve nota sôbre a atividade antibiótica de amostras de raízes de **Aristolochia foetida**, após longo estágio em herbário. Por Oswaldo Gonçalves de Lima e Marisa Pinheiro Machado.

N.º 15. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIII, N.º 2, Univ. Recife, 1955). Primeiras observações sôbre dois antibióticos de espectro restrito, produzidos por **Streptomyces sp.** (cêpa A116 IAUR). Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Pinheiro Machado, Gerson Pereira Pinto, José Otamar Falcão de Morais e Hans Biermann.

N.º 16. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). Uma cêpa de **Streptomyces californicus** (Waksman e Curtis) Waksman e Henrici (1) produtora de um corante antibiótico, indicador ácido-básico. Por José Otamar Falcão de Morais, Oswaldo Gonçalves de Lima, Marisa Pinheiro Machado, Maria H. Dália Maia e Luiz de Albuquerque Araújo.

N.º 17. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). **Streptomyces** A20 (IAUR) — produtor de um antibiótico do grupo da estreptotricina — identificado como **S. cinnamonensis**. Por José Otamar Falcão Morais, Oswaldo Gonçalves de Lima e Maria H. Dália Maia.

N.º 18. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). O **Streptomyces** produtor do antibiótico eurimicina — cêpa 7K1 do IAUR — identificado como **S. lavendulae**. Ligeiro estudo crítico sôbre algumas espécies do grupo do **S. lavendulae**. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, José Otamar Falcão de Morais, Maria H. Dália Maia e Maria Glauce Maciel.

N.º 19. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). Primeiras observações sôbre a ação antimicrobiana do Lapachol. Por Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Marisa Pinheiro Machado, Evans Silva e Gerson Pereira Pinto.

N.º 20. (ANAIS Soc. Biol. Pernambuco, Tomo XIV, Ns. 1-2, Univ. Recife, 1956). Uma nova substância antibiótica isolada do "Pau d'arco", **Tabebuia sp.** Oswaldo Gonçalves de Lima, Ivan Leôncio d'Albuquerque, Marisa Pinheiro Machado, Gerson Pereira Pinto e Maria Glauce Maciel.